

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Infeção por Citomegalovírus: patogénese e diagnóstico da infeção congénita

Ricardo Pedroso da Cruz

Relatório de estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira,
Categoria Professor Auxiliar com agregação.

Mestrado em Análises Clínicas

2024

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Infeção por Citomegalovírus: patogénese e diagnóstico da infeção congénita

Ricardo Pedroso da Cruz

Relatório de estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira,
Categoria Professor Auxiliar com agregação.

Mestrado em Análises Clínicas

2024

Agradecimentos

A tese de mestrado marca o término de uma importante etapa do meu percurso académico, substancial para a minha evolução individual, académica e como profissional de saúde.

O meu agradecimento é dirigido a todos os responsáveis pela realização do estágio no Laboratório Joaquim Chaves Saúde, laboratório de análises clínicas, bem como a todos os profissionais de saúde presentes nas áreas da realização do mesmo.

O meu muito obrigado à minha orientadora de estágio, Dra. Marina Pires, pela sua orientação, dedicação, disponibilidade e apoio constante, e pela sua crucial orientação científica ao longo dos estágios. Aos Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica e aos especialistas nas diversas áreas por me terem dado a oportunidade de adquirir novas competências durante o estágio, pelo auxílio em todas as atividades realizadas, por todos os conhecimentos que me transmitiram e, com o seu exemplo possibilitando-me um crescimento profissional e pessoal fulcral para o meu futuro.

Concomitantemente, o meu especial agradecimento às Técnicas Superiores de Diagnóstico e Terapêutica Liliane Costa e Rita Ribeiro que tão bem me receberam e acolheram no primeiro módulo de estágio. Fizeram com que me sentisse à vontade no laboratório, orientaram-me e auxiliaram-me na realização das diversas tarefas, mostrando-se sempre disponíveis para me ajudar em tudo o que era necessário. Igualmente, à técnica Lúcia Mendes que me ensinou a explorar as ferramentas do Word para aplicar no relatório de estágio.

Paralelamente, o meu muito obrigado aos Técnicos Telma Soares, Luís Miguel, Sara Santos, Catarina Serrano, Paula Cação, Patrícia Fernandes, Rosa Neto e aos biólogos do serviço de genética por também com eles adquirir ferramentas importantes na minha evolução como Técnico de Análises Clínicas e de Saúde Pública.

Ao Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira o meu especial agradecimento por ter aceitado a minha candidatura à realização do trabalho final do Mestrado de Análises Clínicas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela sua compreensão, incentivo e dedicação.

Por fim, agradeço igualmente à coordenadora Doutora Maria Cristina Crespo Ferreira da Silva Marques e aos docentes do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

O relatório de estágio do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa está organizado em duas partes: relatório de estágio e monografia.

O estágio decorreu no Laboratório Joaquim Chaves Saúde, entre o dia 22 de abril e 11 de novembro de 2022, nos módulos Colheitas, Triagem, Hematologia Clínica, Bioquímica Clínica, Química Analítica e Radioimunoensaio e Genética.

A monografia é uma revisão da literatura com o tema “Infeção por Citomegalovírus: patogénese e diagnóstico da infeção congénita”. O citomegalovírus, é a principal causa de infeções congénitas, e concomitantemente é o fator mais comum, não genético, da perda auditiva nos infantes, contribuindo, significativamente, para um atraso do neuro desenvolvimento. Representa, assim, um grave problema de saúde pública.

A transmissão do referido vírus pode ocorrer por várias vias, incluindo contacto direto com fluidos corporais. A infeção congénita só ocorre após a infeção materna. O risco de aparecimento de manifestações clínicas aumenta com a idade gestacional. Na maioria dos casos é assintomática ou com sintomas inespecíficos. Mesmo a exposição prévia da mãe ao vírus (imunizada), não exclui a infeção congénita.

Apesar da sua importância clínica, a infeção congénita não é, frequentemente, detetada, pois apenas 10% dos infetados apresentam manifestações clínicas ao nascimento. Para além que ainda não há nenhuma forma farmacológica disponível, a nível clínico, para a prevenção da transmissão viral.

O diagnóstico pré-natal do citomegalovírus tem um papel significativo na identificação de fetos com elevado risco de desenvolvimento de sequelas. Este baseia-se na seroconversão de imunoglobulinas G, na reatividade das imunoglobulinas M e na possível avidéz das imunoglobulinas G. Consoante os resultados dos testes serológicos, segue-se o algoritmo por meio de amniocenteses à 21^a semana ou por um seguimento pós-natal do feto, em particular, na deteção de DNA viral.

Palavras-chave: Relatório de estágio, Citomegalovírus, Infeção Congénita, Manifestações Clínicas, Diagnóstico

Abstrat

The internship report for the Master Degree of Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon is organized into two parts: internship report and monograph.

The internship took place at the Joaquim Chaves Saúde Laboratory, between April 22nd and November 11th, 2022, in the modules of Phlebotomy, Screening, Clinical Haematology, Clinical Biochemistry, Analytical Chemistry and Radioimmunoassay and Genetics.

The monograph is a review of the literature with the theme “Cytomegalovirus Infection: pathogenesis and diagnosis of congenital infection”. Cytomegalovirus is the main cause of congenital infections, and at the same time it is the most common, non-genetic factor in hearing loss in infants, contributing significantly to delayed neurodevelopment. It therefore represents a serious public health problem.

Transmission of this virus can occur through various routes, including direct contact with bodily fluids. Congenital infection only occurs after maternal infection. The risk of clinical manifestations increases with gestational age. In most cases it is asymptomatic or with non-specific symptoms. Even the mother's previous exposure to the virus (immunized) does not exclude congenital infection.

Despite its clinical importance, congenital infection is often not detected, as only 10% of infected people present clinical manifestations at birth. In despite, there is still no pharmacological way available, at a clinical level, to prevent viral transmission.

Prenatal diagnosis of cytomegalovirus plays a significant role in identifying fetuses at high risk of developing sequelae. This is based on the seroconversion of immunoglobulins G, the reactivity of immunoglobulins M and the possible avidity of immunoglobulins G. Depending on the results of the serological tests, the algorithm is followed by means of amniocentesis at the 21st week or by postnatal follow-up of the fetus in the detection of viral DNA.

Keywords: Internship report, Cytomegalovirus, Congenital Infection, Clinical Manifestations, Diagnosis

Lista de siglas e abreviaturas gerais

JCS - Joaquim Chaves Saúde

RIA - Radioimunensaio

PSA - Antígeno específico da próstata

EDTA - Ethylene Diamine Tetraacetic Acid / Ácido Etileno-Diamino-Tetracético

ACTH - Hormona adrenocorticotrópica

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

FSC - Luz dispersa direta

SSC - Luz dispersa lateral

SFL - Luz fluorescente lateral

HB - Hemoglobina

SLS - Sulfato Lauril de Sódio, Livre de Cianeto

GV - Glóbulos Vermelhos

HT - Hematócrito

VGM - Volume Globular Médio

HGM - Hemoglobina Globular Média

CMHG - Concentração Média de Hemoglobina Globular

RDW - Índice de Dispersão Eritrocitária

FL - Fentolitros

PG - Picogramas

SD - Distribuição Normal de Eritrócitos

VSE - Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

mm - Milímetros

HBA1C - Hemoglobina Glicada

TP - Tempo de Protrombina

TTPa - Tempo da Tromboplastina Parcial Ativada

ADP - Difosfato de Adenosina

INR - Razão Normalizada Internacional

ISI - Índice de Sensibilidade Internacional

TT - Tempo de Trombina

Ags - Antígenos

PAI - Pesquisa de Anticorpos Irregulares

IAI - Identificação de Anticorpos Irregulares

RBC - Glóbulos Vermelhos

WBC - Glóbulos Brancos

HYA - Cilindros Hialinos

PAT - Cilindros Patológicos

XXI Mestrado em Análises Clínicas
Relatório de estágio

SEC - Células Epiteliais Escamosas

NEC - Células Epiteliais de Transição e Células Epiteliais Tubulares Renais (não escamosas)

BAC - Bactérias

YEA - Leveduras

CRY - Cristais

MUC - Muco

SPERM - Espermatozoides

DIG - Diagnóstico Imunológico da Gravidez

HCG - Gonadotropina Coriônica Humana

ECL - Eletroquimioluminescência

TSH - Hormona Estimulante da Tireoide

FT3 - Triiodotironina livre

ICO - Índice de Cutoff

GFAAS - Tecnologia de absorção Atômica em Forno de Grafite

PLP - Fosfato Piridoxal

FTIR - Tecnologia de Espetroscopia de Infravermelhos

PPM - Partes por Milhão

NDIF- Tecnologia de Espetroscopia de Infravermelhos Não Dispersiva

I - Iodo

PCR- Polymerase Chain Reaction

CNV - Copy Number Variations

CNC - Copy Number Change

CNA - Copy Number Alteration

CT - Sinal de Fluorescência

CQI - Controlo da Qualidade Interno

CQE - Controlo da Qualidade Externo

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)

UK NEQAS - National External Quality Assessment Schemes

RIQAS - Randox International Quality Assessment Scheme

CMV - Citomegalovírus

RN - Recém-Nascido

TMF - Transmissão Materno Fetal

SNC - Sistema Nervoso Central

PANS - Perda Auditiva Neurosensorial

IgM - Imunoglobulinas M

IgG - Imunoglobulinas G

Lista de tabelas e figuras gerais

Tabela 1: Punção venosa

Tabela 2: Tubo com EDTA e Heparina de lítio

Tabela 3: Tubo com Citrato de sódio

Tabela 4: Tubo seco, tubo com Heparina de sódio e tubo com EDTA gel

Tabela 5: Critérios de rejeição de amostras e possíveis medidas corretivas

Tabela 6: Valores normais da fórmula leucocitária

Tabela 7: Valores de referência da velocidade de sedimentação

Figura 1: Modelo da cascata da coagulação

Figura 2: Cobas 8000 e os seus módulos (ISE, dois c701, dois e801)

Tabela 8: Intervalos de tempo dos protocolos dos testes

Figura 3: Representação gráfica de um PCR em tempo real

Figura 4: Potenciais alvos de infeções virais congénitas

Tabela 9: Principais características clínicas e laboratoriais em crianças infetadas congenitamente pelo CMV

Figura 5: Algoritmo proposto para o *screening* do CMV

Figura 6: Algoritmo proposto para as mulheres grávidas infetadas pelo CMV

Figura 7: Exemplo de um Guthrie Card português para o programa nacional do rastreio neonatal (teste do pezinho)

Figura 8: Diagrama utilizado com base nos Guthrie Cards

Índice

Parte I

1.	Introdução.....	13
2.	Circuito analítico.....	14
2.1	Fase Pré Analítica.....	14
2.1.1	Colheita de amostras.....	14
2.1.2	Transporte e receção de amostras.....	17
2.2	Fase Analítica.....	18
2.2.1	CORE.....	18
2.2.1.1	Hematologia Clínica.....	19
2.2.1.2	XN-10.....	20
2.2.1.3	Hemograma.....	22
2.2.1.4	Esfregaço de sangue periférico.....	27
2.2.1.5	Interrliner XN FRL.....	28
2.2.1.6	Cobas c513.....	29
2.2.1.7	Sta R Max.....	29
2.2.1.8	Ortho Vision Max.....	34
2.2.2	Bioquímica Clínica.....	36
2.2.2.1	Cobas p471 e p612.....	37
2.2.2.2	Cobas u6500.....	37
2.2.2.3	Cobas 8000 Modular Analyzer Series.....	40
2.2.2.4	Técnicas manuais.....	44
2.3	Fatores que podem interferir nos resultados das análises.....	45
2.4	Química Analítica + RIA.....	45
2.4.1	Química Analítica.....	46
2.4.2	RIA.....	48
2.5	Genética.....	50
2.5.1	Citogenética.....	51
2.5.2	Biologia molecular.....	52
2.6	Fase Pós Analítica.....	54

3.	Controlo da qualidade	54
4.	Calibrações	56
5.	Conclusão	57
Parte II		
6.	Introdução	59
7.	Manifestações Clínicas da Infecção Congénita.....	60
8.	Diagnóstico	64
9.	Tratamento/Profilaxia e Vacinação.....	68
10.	Conclusão	70
11.	Referências Bibliográficas Gerais	71
12.	Anexos.....	78

Parte I

1. Introdução

O estágio do Mestrado de Análises Clínicas tem o intuito de desenvolver o trabalho de equipa, bem como enquadrar e expandir conhecimentos teóricos e práticos importantíssimos para o futuro profissional.

Deste modo, as relações interpessoais, a destreza prática e conteúdos relacionados com o processamento de amostras e equipamentos são treinados e novas metodologias são alcançadas.

Posto isto, o sentido de responsabilidade, a experiência, o profissionalismo e ética profissional são mais-valias para uma posterior integração numa equipa laboratorial, onde é necessário interpretar e inferir resultados de amostras, tendo em consideração o diagnóstico e o respetivo historial clínico do doente.

Como parte da experiência do estágio, acompanhei vários técnicos, os quais têm distintas formas de trabalhar, o que me permitiu encontrar a minha forma de trabalhar sempre procurando o mesmo desfecho.

Este relatório de estágio tem o propósito de descrever os conteúdos explorados e adquiridos ao longo do estágio do Mestrado de Análises Clínicas, nos módulos de Colheitas, Triagem, Hematologia Clínica, Bioquímica Clínica, Química Analítica e Radioimunoensaio (RIA) e Genética que decorreram entre o dia 22 de abril e 11 de novembro, no ano letivo 2021/2022, no Laboratório Joaquim Chaves Saúde (JCS).

“Com mais de 60 anos de existência, a JCS tem hoje uma posição consolidada e de reconhecido relevo no domínio da medicina em Portugal.

Após a criação do Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves, a primeira empresa a ser constituída, a JCS cresceu de forma sustentada no sector da saúde com a sucessiva abertura de modernas unidades em Portugal Continental, Madeira e Açores, com particular destaque para as áreas de Laboratório - Análises Clínicas, Clínicas Médicas e Tratamento Oncológico.

A excelência dos profissionais de saúde, a abrangente área de intervenção clínica e técnica e os sofisticados meios de diagnóstico e terapêutica, integrados em modernas instalações, afirmam a JCS como um dos mais importantes protagonistas na prestação de cuidados de saúde em Portugal, iniciando-se em 2014 a sua internacionalização.” (1)

2. Circuito analítico

O circuito analítico é todo o percurso de amostras biológicas que tem como finalidade o estudo dos seus constituintes. Divide-se em três fases distintas: Fase Pré Analítica, Fase Analítica e Fase Pós Analítica.

2.1 Fase Pré Analítica

Esta fase é de extrema importância, visto que diversos estudos indicam que, até 70% dos erros ocorrem durante a mesma (2). Necessita de cuidados na deteção, classificação e adoção de medidas para a redução de falhas, contribuindo, assim, para a melhoria das fases seguintes. A participação de todos os profissionais envolvidos, desde quem marca as análises, à informação necessária para a preparação do doente, a sua inscrição, recolha das amostras biológicas e o próprio transporte e conservação das mesmas, é muito importante para que a monitorização, prognóstico e diagnóstico seja feito com o maior rigor possível.

2.1.1 Colheita de amostras

Previamente ao ato em si da colheita, é necessário efetuar um inquérito para averiguar o estado do doente, uma vez que este pode interferir nos resultados das análises. Passa por determinar se o doente está em jejum, as suas condições fisiopatológicas (por exemplo a gravidez, diabético), se está a tomar alguma terapêutica medicamentosa, a razão pela qual está a realizar as análises, se realizou algum exame com contraste imagiológico ou algum exame específico que possa interferir com os resultados. Como é o caso do doseamento do antigénio específico da próstata (PSA) em que a manipulação do aparelho urinário, nomeadamente a cistoscopia influencia os resultados (3). O inquérito tem como objetivo auxiliar a validação técnica e biopatológica dos resultados.

A colheita de sangue compreende vários tipos, no entanto apenas se realizou a punção venosa:

Tabela 1: Punção venosa.

Punção venosa	<ul style="list-style-type: none">• Método mais utilizado para a colheita de sangue periférico;• Para a realização da punção venosa o doente deve estar deitado ou sentado numa cadeira confortável com o braço firmemente suportado numa mesa ou na própria cadeira.
----------------------	--

A punção venosa pode efetuar-se na fossa antecubital (veias cefálica, cefálica mediana e basílica), no dorso da mão, na face anterior do antebraço, no dorso do pé, na jugular externa (ato médico) (4,5).

A veia mais usada é a cefálica mediana, pois apresenta um maior calibre, fornecendo uma maior quantidade de sangue. Visto estar alojada nos músculos, não foge, sendo, por isso, a colheita mais fácil, mais rápida e menos dolorosa (4,6).

Para a execução de uma boa colheita é necessário respeitar a quantidade necessária de sangue, para que este esteja na proporção adequada relativamente ao anticoagulante, se for o caso. Aquando da realização da colheita, a ordem pela qual se escolhem os tubos é importante, sendo em primeiro lugar colhido sangue para o tubo de coagulação, seguindo para o seco, isento de metais, Heparina de lítio e Heparina de sódio e por fim o tubo para com Ácido Etileno-Diamino-Tetracético (EDTA- Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) com e sem gel. A garrotagem por tempo excessivo também deve ser evitada. Caso a localização da veia a puncionar seja demorada deve-se aliviar o garrote, para que não interfira nas análises (amostras hemolisadas).

A punção venosa pode ser feita pelo método tradicional, o da agulha e seringa, ou por um sistema de vácuo com ou sem uso da *butterfly*.

Etapas para a realização da colheita de sangue:

- Efetuar a chamada do utente pelo sistema operativo;
- Saudar o utente e acomodá-lo;
- Fazer a confirmação do nome do utente e a sua data de nascimento (identificação positiva) para que não ocorra erro na sua identificação;
- Preparar o material de colheita e identificar os tubos correspondentes;
- Preparar o utente, ou seja, colocar o garrote para visualizar e escolher a zona a puncionar;
- Desinfetar a zona a puncionar com etanol e para o doseamento da alcoolémia esta é feita com betadine;
- Efetuar a punção venosa.

A colheita de urina, nomeadamente, a primeira da manhã é uma amostra concentrada, o que garante a deteção de diversas substâncias. Deve-se instruir o doente para limpar metodicamente os genitais externos, de frente para trás na mulher e a glande nos homens, ou a região perineal nas crianças antes de colher a amostra (7).

Para a urina de 24 horas, tal como o próprio nome indica, a urina deve corresponder ao conjunto de micções realizadas durante 24 horas, em que a primeira urina, do primeiro dia, deve ser rejeitada, recolhendo-se todas as outras urinas, inclusivamente a urina da manhã seguinte, para desta forma completar o ciclo de 24 horas para um recipiente fornecido pelo laboratório.

Tubos de colheita utilizados

Para uma realização correta de análises é necessário conhecer os tubos utilizados, quais as suas utilidades e qual o seu conteúdo. No laboratório são utilizados os tubos que contêm EDTA com e sem gel, Citrato de sódio, tubo seco (incluindo tubos isentos de metais), Heparina de lítio e Heparina de sódio e tubos de plástico inerte para a análise de líquidos (por exemplo as urinas tipo II).

Tabela 2: Tubo com EDTA e Heparina de lítio.

Hemograma, Hemoglobina glicada, Esfregaço sangue periférico, Velocidade de sedimentação, Doseamento dos Imunossuppressores
<p>O EDTA atua através da formação de um complexo com iões cálcio, formando um sal não ionizável. É o anticoagulante recomendado para o setor da Hematologia por ser o que melhor preserva a morfologia das células sanguíneas (8).</p> <p>Os tubos com Heparina de lítio são utilizados para o doseamento da albumina glicada para o controlo da diabetes mellitus. Quando não é possível recorrer à hemoglobina glicada, nomeadamente nos casos com hemoglobinopatias, gravidez e doenças renais crónicas (9).</p>

Tabela 3: Tubo com Citrato de sódio.

Coagulação
<p>O Citrato de sódio é o anticoagulante de eleição para os estudos da coagulação, visto que o seu efeito pode ser facilmente revertido com a adição de cálcio durante as análises de coagulação. Atua ao combinar-se com o cálcio no sangue formando assim um composto de cálcio não ionizado, inibindo desta forma a cascata de coagulação. Assim sendo, permite obter o plasma necessário para a realização dos testes da coagulação (10).</p>

Tabela 4: Tubo seco, tubo com Heparina de sódio e tubo com EDTA gel.

Bioquímica e Imunologia
<p><u>Tubo Seco</u></p> <p>O ativador da coagulação presente no tubo seco precipita a ativação da cascata da coagulação e consequentemente diminui o tempo de formação do coágulo, permitindo a separação do soro (11). Utiliza-se diretamente nos equipamentos automatizados.</p>
<p><u>Tubo com Heparina de sódio</u></p> <p>A heparina vai atuar como um anticoagulante ao potenciar a formação do complexo antitrombina e os fatores de coagulação da serina protéase ativados. Inibindo a trombina, fator X e por consequência a cascata da coagulação. Tem como finalidade a realização de técnicas de Citogenética, permitindo a análise e classificação de cromossomas (6,12).</p>
<p><u>Tubo EDTA gel</u></p> <p>O gel presente nos tubos com EDTA formam uma resistente barreira entre os componentes celulares do sangue e o plasma obtidos na centrifugação (13). Utilizando o plasma, por exemplo, para o doseamento da hormona adrenocorticotrópica (ACTH).</p>

2.1.2 Transporte e receção de amostras

As amostras chegam dos diversos postos e laboratórios ao longo do dia. São entregues à sala de triagem, devidamente acondicionadas, onde se procede à observação, avaliação e a entrada no sistema informático das amostras, com a finalidade de as aceitarem ou rejeitarem, caso seja necessário. No fim do processo são enviadas para as restantes áreas do laboratório.

O seu acondicionamento é feito através de uma embalagem hermética, estanque e inquebrável com proteção da exposição direta da luz. A embalagem tem compartimentos refrigerados (entre 2 a 12º centígrados) e à temperatura ambiente.

Critérios de rejeição de amostras:

Tabela 5: Critérios de rejeição de amostras e possíveis medidas corretivas.

Principais ocorrências	Medida corretiva
<ul style="list-style-type: none">• Amostra coagulada;• Amostra hemolisada;• Amostra com volume incorreto;• Amostra colhida em tubo/material incorreto (urinas que não deviam estar acidificadas, por exemplo);• Amostra acondicionada de forma incorreta (tubos sujos, partidos);	<ul style="list-style-type: none">• Rejeição da amostra e consequente pedido de nova colheita.

2.2 Fase Analítica

Esta fase é bastante automatizada, e por isso é necessário prestar uma atenção cuidada quanto ao funcionamento dos equipamentos, e quanto ao processamento das amostras nos mesmos. Assim, os equipamentos devem encontrar-se devidamente calibrados e controlados para o seu bom funcionamento.

Antes de todos os parâmetros serem avaliados, nenhum equipamento é colocado “online”, de modo que nenhuma amostra seja analisada sem que o controlo da qualidade tenha sido validado. À exceção, por exemplo dos equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em que os controlos são feitos ao mesmo tempo que as amostras. No fim da técnica consoante os valores dos controlos esta é validada ou não.

Apesar da maior parte das análises serem executadas de forma automatizada, os Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica têm o dever de possuir conhecimentos teóricos que lhes permita solucionar qualquer problema existente e perceber se os resultados estão em conformidade ou não, visto que os equipamentos não utilizam métodos totalmente infalíveis.

2.2.1 CORE

O CORE abrange as áreas de Hematologia Clínica, Imunohematologia, Bioquímica Clínica, Alergologia, Eletroforeses e a validação dos resultados.

2.2.1.1 Hematologia Clínica

A Hematologia Clínica, é responsável pelo estudo do sangue e por todos os seus componentes e tecidos hematopoiéticos, incluindo o domínio de Imunohematologia.

Assim, este ramo da medicina auxilia o diagnóstico de diversas patologias hematológicas permitindo o combate a estas, cedendo informações fulcrais para a monitorização e o tratamento dos doentes afetados. Este tipo de patologias pode provocar danos muito graves, sendo que o seu diagnóstico é indispensável para que os doentes possam receber a terapia adequada, melhorando o seu bem-estar (6).

Esse estudo é feito através de:

- Hemogramas, que fazem a análise dos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, plaquetas e alguns dos seus precursores medulares, nomeadamente reticulócitos;
- Observação de esfregaços de sangue periférico;
- Estudo da coagulação;
- Teste de Velocidade de Sedimentação Eritrocitária;
- Grupo sanguíneo, fenótipo, pesquisa de anticorpos irregulares e identificação dos mesmos.

Objetivos

1. Identificação do tipo de produto biológico necessário à execução de cada parâmetro;
2. Conhecimento das condições exigidas para a obtenção dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos da manipulação;
3. Conhecimento das condições de separação e armazenamento dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos de manipulação;
4. Execução dos parâmetros de Hematologia básica;
5. Execução de metodologias relacionadas com o diagnóstico e a monitorização de doenças hemato-oncológicas;
6. Execução de metodologias relacionadas com o diagnóstico e a monitorização de patologias trombóticas e hemorrágicas;
7. Manuseamento, tratamento e interpretação dos resultados das amostras de controlo da qualidade interno e de avaliação externa da qualidade.

Esta secção do CORE é composta por vários equipamentos, tendo como objetivo o de auxiliar na monitorização, prognóstico e diagnóstico do clínico, que são: Sysmex-9000, composto por quatro Sysmex XN-10 (realiza os hemogramas), SP-10 (responsável pela execução dos esfregaços de sangue periférico e da coloração) e DI-60 (Cella Vision responsável pela identificação das células presentes nos esfregaços). Dois Sta R Max (para o estudo da coagulação), o Interrliner XN FRL (determinação da velocidade de sedimentação), Cobas c513 (responsável pelo doseamento das hemoglobinas glicadas) e o Ortho Vision Max (Imunohematologia).

2.2.1.2 XN-10

O CORE utiliza quatro equipamentos automatizados, capazes de efetuarem contagens diferenciais celulares, auxiliando a monitorização, prognóstico e diagnóstico baseado no estudo e na análise das células sanguíneas, sendo totalmente automatizado.

Princípios

Eritrócitos e Plaquetas: Medição da Impedância com focagem hidrodinâmica

A contagem de eritrócitos e das plaquetas é realizada com base no princípio de impedância elétrica, o que significa que na micro-abertura da passagem do sangue existe um campo elétrico. À medida que os eritrócitos e as plaquetas passam pela micro-abertura, é observada uma resistência elétrica, a impedância, criada entre dois elétrodos situados em extremidades opostas dessa micro-abertura (14,15).

O campo elétrico é constante, o que significa que quando ocorre a passagem das células nessa micro-abertura haverá uma alteração nesse mesmo campo, provocando uma resistência reconhecível pelo equipamento (14,15).

Assim, a resistência elétrica é proporcional ao tamanho das células, ou seja, os elementos sanguíneos maiores (eritrócitos) geram uma maior impedância, enquanto células mais pequenas (plaquetas) geram uma impedância menor. Esta diferenciação de impedâncias é possível, visto que é medida em função do tempo que os elementos levam durante a passagem pela micro-abertura. Esta variação de tempo/impedância é convertida em pulsos, que são expressos graficamente pelo equipamento (14,15).

Desta forma, o equipamento consegue diferenciar estes dois tipos de elementos sanguíneos, dando um número absoluto e em percentagem, da quantidade de eritrócitos e de plaquetas (14,15).

Leucócitos (contagem diferencial): Citometria de Fluxo por Fluorescência

A citometria de fluxo usa um laser semiconductor que quantifica e qualifica as células. Este, irradia-as com um feixe de laser de 633 nm e analisa a luz dispersa direta (FSC), luz dispersa lateral (SSC) e luz fluorescente lateral (SFL). A intensidade dos dois tipos de luz dispersa (FSC e SSC) reflete a estrutura da superfície celular, a forma das partículas, a forma do núcleo, o índice de refração e a refletividade das células. Em geral, o sinal do FSC é mais forte para células de maiores dimensões e o sinal do SSC intensifica-se à medida que as estruturas intracelulares se tornam mais complexas. A intensidade da SFL reflete, principalmente, o tipo e a quantidade de ácidos nucleicos e organelos celulares. Esses três sinais são usados para diferenciar e contar glóbulos brancos, glóbulos vermelhos nucleados, reticulócitos e plaquetas, e para detetar células anormais e células imaturas com a ajuda de algoritmos e tecnologia digital exclusivos (15).

Método de deteção de Hemoglobina SLS

O método SLS-hemoglobina (HB) utiliza sulfato lauril de sódio, livre de cianeto (SLS) para medir a concentração da HB. O mecanismo de reação do método SLS-HB é o seguinte (16):

1. Reação hemolítica entre SLS e a membrana dos glóbulos vermelhos:
 - O SLS liga-se à membrana dos glóbulos vermelhos por ligação iónica e parcialmente por ligação hidrofóbica. Isso leva à solubilização dos fosfolípidios da membrana, libertando a HB do interior dos glóbulos vermelhos.
2. Alteração na estrutura tridimensional da globina pelo SLS:
 - A HB livre, libertada pela hemólise, sofre uma alteração na sua estrutura tridimensional devido à ligação entre o grupo hidrofóbico do SLS e a globina.
3. Oxidação do grupo heme pelo oxigénio:
 - Simultaneamente, com a mudança na estrutura tridimensional da globina, o grupo heme divalente é facilmente alterado para ferro trivalente pelo oxigénio ligado ao grupo heme ou ao oxigénio dissolvido.
4. Ligação do SLS:
 - Os grupos hidrofílicos de SLS ligam-se ao grupo heme trivalente para formar SLS-HB estável.

2.2.1.3 Hemograma

O hemograma tem a finalidade de fornecer informações resultantes do exame das células sanguíneas, ou seja, da contagem do número total de glóbulos vermelhos, leucócitos e plaquetas, e da contagem diferencial de leucócitos (6).

De acordo com o estudo da função hematológica, a avaliação das características quantitativas e qualitativas dos elementos celulares sanguíneos é fundamental, uma vez que é um coadjuvante indispensável no diagnóstico e no controlo evolutivo das doenças infecciosas, das doenças crónicas em geral, das emergências médicas cirúrgicas e traumatológicas, e no acompanhamento de quimioterapia e radioterapia (6).

Por vezes são utilizadas outras ferramentas que auxiliam e complementam o estudo da morfologia deste tipo de células. Nestes casos, os hemogramas podem vir acompanhados de um esfregaço de sangue periférico realizado com o intuito de confirmar ou esclarecer os resultados de alguns parâmetros estudados.

O hemograma analisa e avalia diversos parâmetros hematológicos sendo composto pelo eritograma, leucograma e plaquetograma (6).

Eritograma

O eritograma destina-se ao estudo dos eritrócitos indicando o resultado de diversos parâmetros:

- Número Total de Glóbulos Vermelhos (GV);
- Concentração de HB;
- Hematócrito (HT);
- Volume Globular Médio (VGM);
- Hemoglobina Globular Média (HGM);
- Concentração Média de Hemoglobina Globular (CMHG);
- Índice de Distribuição Eritrocitária (RDW).

Número Total de Glóbulos Vermelhos (GV)

A contagem de eritrócitos indica o valor do número de GV por $\times 10^{12}/L$ de sangue (6).

Este parâmetro hematológico indica se existe uma eritrocitose, ou seja, se o número de eritrócitos se encontra acima dos valores de referência, uma eritropénia, em que o número de eritrócitos se encontra abaixo dos valores de referência ou um número de eritrócitos entre os valores normais de referência (6).

Os valores de referência encontram-se entre 4,31 e 6,40 $\times 10^{12}/L$ de sangue nos homens e 3,85 e 5,20 $\times 10^{12}/L$ nas mulheres (17).

Concentração de Hemoglobina

A HB corresponde ao componente principal do eritrócito. Este parâmetro hematológico indica a concentração de HB no sangue, expresso em gramas/decilitro (g/dl) de sangue (6).

É uma proteína pigmentada que ocupa cerca de um terço do volume total da célula e que tem como função o transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos (6).

Valores baixos de HB são indicadores de uma anemia (6).

Os valores de referência encontram-se entre 13,6 e 18,0 g/dl nos homens e 11,5 e 16,0 g/dl nas mulheres (17).

Hematócrito (HT)

É a medição da percentagem de volume de GV em relação ao volume de sangue total. O hematócrito reflete estreitamente os valores da HB e dos eritrócitos. A observação de valores anormais indica os mesmos estados patológicos sugeridos por anormalidades na contagem de eritrócitos e nas concentrações de HB. Os valores reduzidos indicam uma hemodiluição e uma hemoconcentração com os valores aumentados (6). É determinado a partir da seguinte fórmula:

$$HT = \frac{VGM \times GV}{10}$$

Os valores de referência encontram-se entre 39,8 e 52% no homens e 34,7 e 46% (0,398 a 0,520 e 0,347 a 0,460 respetivamente) (17).

Índices eritrocitários

Volume Globular Médio (VGM)

Este parâmetro hematológico indica o volume médio dos eritrócitos expresso em fentolitros (fL), dando indicação acerca do seu tamanho (macrocitose e microcitose) (6).

Valores elevados podem indicar o défice de ácido fólico e de vitamina B12 característicos de uma anemia megaloblástica e de uma anemia perniciosa (anemias macrocíticas). Ainda, uma das causas para este aumento são as anemias não megaloblásticas que têm como origem, por exemplo o álcool e drogas citotóxicas. Por outro lado, valores diminuídos podem indicar que existe uma anemia ferropénica e que o doente pode ter défice de ferro ou hemoglobinopatias (6).

Os valores de referência encontram-se entre 80 e 97 fL (17).

Hemoglobina Globular Média (HGM)

Este índice eritrocitário indica o peso médio da HB nos eritrócitos, sendo expresso em picogramas (pg), podendo saber-se, assim, a concentração que cada eritrócito tem (6). É determinado através da seguinte fórmula:

$$HGM = \frac{HB \times 10}{GV}$$

Desta maneira, quando os eritrócitos são normocrómicos a sua quantidade está compreendida entre os valores normais, são hipocrómicos quando a quantidade de HB nos eritrócitos é reduzida (6).

A hipocromasia pode auxiliar na distinção entre anemias, visto que é característica de algumas delas, nomeadamente as anemias por défice de ferro (6).

Os valores de referência encontram-se entre 25 e 34 pg (17).

Concentração Média da Hemoglobina Globular (CMHG)

A CMHG indica a concentração de HB no eritrócito, relacionando-se a quantidade de HB e o volume do eritrócito (6).

Um valor abaixo do normal é característico das anemias hipocrómicas. Se a CMHG for superior a 36,0 g/dl é de suspeitar aglutininas frias, esferocitose ou de outro fator que altere o resultado, como por exemplo um coágulo (6).

É calculado pela seguinte fórmula:

$$CMHG = \frac{HB}{HT}$$

Os valores de referência encontram-se entre 32,0 e 36,0 g/dl (17).

Índice de Distribuição Eritrocitário (RDW- Red Cell Distribution Width)

O RDW representa o índice de variação do tamanho dos eritrócitos. Se o seu valor for superior a 15% indica anisocitose, isto é, eritrócitos de diferentes tamanhos. Variações na amplitude de distribuição dos eritrócitos podem ser úteis na classificação de certos tipos de anemias (6).

É calculado diretamente através do VGM, por comparação com valores estatísticos da distribuição normal de eritrócitos (SD), permitindo que, desta forma, seja possível verificar a presença/ausência de anisocitose.

Reticulócitos

A contagem do número de reticulócitos no sangue periférico é bastante útil e oferece informações importantes acerca da atividade da medula, ou seja, se um doente estiver com uma anemia terá um défice de HB e a medula vai responder de acordo com as necessidades do organismo (6).

Assim, vai tentar produzir mais eritrócitos para compensar a anemia e estes são lançados ainda na sua forma imatura, daí a contagem de reticulócitos ser importante para observar se a hematopoiese está ou não a ser realizada de forma correta, em resposta ao défice de HB. Este parâmetro é importante em casos de anemia ferropénia e na distinção entre anemias regenerativas (reticulocitose elevada) e arregenerativas (não apresentam reticulócitos aumentados). O resultado é expresso em percentagem (%) e em número absoluto de reticulócitos traduz-se por uma relação com o número total de eritrócitos (6).

Os valores de referência encontram-se entre 0,5 e 2,5% e o número absoluto encontra-se entre 50 e $150 \times 10^9/L$ (6).

Leucograma

O leucograma destina-se ao estudo, qualitativa e quantitativamente, dos leucócitos (6).

Contagem de leucócitos

Consiste na contagem do número de glóbulos brancos por $\times 10^9/L$ (6).

Os valores normais da contagem de leucócitos, dependendo de diversos fatores como a idade (adulto) ou o estado patológico do doente, situam-se entre 4,0 e 10,0 leucócitos por $\times 10^9/L$ (17).

Posto isto, quando o número de leucócitos se encontra acima de $10 \times 10^9/L$ existe uma leucocitose e quando o número de leucócitos se encontra abaixo de $4,0 \times 10^9/L$ existe uma leucopenia (6).

Contagem diferencial de leucócitos

O resultado pode ser expresso em número absoluto por litro e/ou em percentagem (17).

Tabela 6: Valores normais da fórmula leucocitária.

Tipo de leucócito	Número absoluto
• Neutrófilos	1,5-8,0 x 10 ⁹ /L
• Eosinófilos	0,0-0,3 x 10 ⁹ /L
• Basófilos	0,0-0,3 x 10 ⁹ /L
• Linfócitos	0,8-4,0 x 10 ⁹ /L
• Monócitos	0,2-0,8 x 10 ⁹ /L

A interpretação dos resultados deve basear-se e incidir nos valores absolutos, porque apesar de algum tipo de leucócito estar alterado percentualmente, pode estar dentro do intervalo de referência (6).

Se algum parâmetro estiver fora dos valores de referência, a análise dos resultados deve ter em conta o tipo de leucócitos alterado, bem como a sua quantificação (6).

Em casos de leucocitose, o doente pode apresentar lesões tecidulares, hemorragias ou até mesmo algum tipo de leucemia (6).

Por outro lado, uma leucopenia pode traduzir uma falência a nível da medula óssea ou infeções através de vírus, bactérias ou proveniente da quimioterapia (6).

Trombocitograma

O trombocitograma destina-se ao estudo das plaquetas quanto ao número (plaquetócrito), volume plaquetar médio e índice de distribuição (6).

Os valores normais de contagem das plaquetas situam-se entre 140,0 e 400,0 plaquetas por x10⁹/L de sangue (17).

Valores acima de 400,0 plaquetas por x10⁹/L de sangue indicam uma trombocitose e valores abaixo de 140,0 plaquetas por x10⁹/L de sangue indicam trombocitopenia (6).

No primeiro caso, pode dever-se a distúrbios mieloproliferativos, como por exemplo leucemias ou linfomas e inflamações (6).

Uma trombocitopenia pode dever-se a uma falência da medula óssea incapaz de formar plaquetas, destruição plaquetária aumentada, plaquetas gigantes, agregados plaquetários, linfomas, leucemias e tratamento farmacológico (6).

2.2.1.4 Esfregaço de sangue periférico

O esfregaço de sangue periférico oferece aos Patologistas Clínicos, um aspeto geral (forma, tamanho, cor, inclusões) de todos os elementos sanguíneos (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) quando observado ao microscópio ótico, assim como de alguns elementos que os originam. Para quem observa um esfregaço, é necessário dominar conhecimentos teóricos e práticos de Hematologia, para desta forma conseguir compreender o que está exposto no esfregaço (6,18)

Para além disso, deve-se ter sempre em conta o historial clínico de cada doente, visto que este pode tornar-se um dos elementos mais importantes para o diagnóstico correto de certas patologias.

Os esfregaços de sangue periférico são realizados com sangue total contido em tubos de colheita com EDTA.

Na Secção de Hematologia (SP-10) são realizados esfregaços em diversas situações (anexo I). Os esfregaços vão servir como material de apoio na validação de resultados ou no auxílio ao diagnóstico de patologias.

Coloração

No CORE, as colorações são feitas pelo equipamento SP-10. Estas têm o objetivo de auxiliar a visualização de esfregaços de sangue periférico e esfregaços de líquidos biológicos, ao porem em evidência substâncias químicas nas células ou ainda a atividade de um sistema enzimático (6,19).

Assim, nas colorações citoquímicas visualizam-se substâncias intracelulares que apresentam cores específicas, sendo observáveis ao microscópio ótico. Este tipo de colorações é favorecido por uma reação química, como é o exemplo da coloração de May-Grunwald-Giemsa.

Esta coloração consiste na utilização de dois corantes diferentes, May-Grunwald e Giemsa. O corante May-Grunwald é uma mistura de eosina, azul-de-metileno e metanol, que quimicamente se transforma em eosinato de azul-de-metileno e que irá fixar o esfregaço. O corante Giemsa consiste numa mistura de azur II e eosinato de azur II (19).

Estes dois corantes pertencem ao grupo dos corantes de Romanowsky, os mais comuns e universalmente empregues. O seu princípio baseia-se na afinidade das estruturas celulares para o corante, dependendo do pH destas últimas. Esta coloração permite a obtenção de bons resultados (uma grande quantidade de estruturas coradas e uma boa diferenciação de estruturas) (19).

2.2.1.5 Interrliner XN FRL

O Interrliner XN FRL é o equipamento utilizado no CORE para a execução da velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE). É utilizado para análises de amostras de sangue total colhido em tubos de EDTA.

Os resultados são obtidos à temperatura de 18°C, através do método Westergren, com a análise automática após 30 a 60 minutos (20).

A leitura é feita nas pipetas de sedimentação Westergren, através de um sensor ótico que se move ao longo das mesmas. O sensor lê a absorção de luz infravermelha através das diferentes fases de sedimentação (20).

Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

Primeiramente, ocorre a formação de agregados eritrocitários, devido à ação da gravidade, que vão descendo ao longo do tubo, para que em seguida ocorra a fase de compressão (6).

O sangue não pode estar coagulado nem hemolisado, sendo que a VSE é determinada com base na distância da porção superior dos eritrócitos sedimentados até à porção superior do plasma, expressa em milímetros (mm) por hora (6).

Existem alguns fatores que podem interferir no tempo de sedimentação, tais como o volume, a forma e a densidade dos eritrócitos. Outros fatores associados prendem-se com o anticoagulante utilizado, vibração ou até mesmo com a inclinação do tubo. É importante que este tenha a quantidade suficiente de amostra, para que a leitura seja executada de forma correta (6).

Esta prova tem o intuito de auxiliar o diagnóstico do doente numa doença infecciosa, inflamatória ou neoplásica (6).

O estudo da velocidade de sedimentação pode ser expresso numa curva em forma de S, constituída por três fases:

- 1ª fase (parte inicial de descida muito lenta): corresponde à formação de agregados eritrocitários;
- 2ª fase (parte intermédia de descida rápida): rápida descida dos empilhamentos (*rouleaux*);
- 3ª fase (parte final de descida lenta): fase de compressão devido ao empacotamento dos *rouleaux* no fundo da pipeta.

Tabela 7: Valores de referência da velocidade de sedimentação.

Sexo	Valores de referência (mm/hora)
Masculino	<10
Feminino	<15

2.2.1.6 Cobas c513

O cobas c513 é responsável pelo doseamento da hemoglobina glicada (HBA1c). A HBA1c resulta da fixação não-enzimática da glicose à HB (não se deve confundir com glicosilação, que significa que a fixação é resultante de uma reação enzimática). A HBA representa cerca de 95-97% da HB presente num adulto normal. Esta subdivide-se em diversas frações, sendo uma delas a HB glicada (fração A1c). A concentração desta fração da HB reproduz a média dos níveis de glicemia entre 60 e 90 dias, aquando da realização da análise. Esta média é possível, porque a glicação da HB é um processo irreversível que ocorre lentamente durante toda a sobrevida dos eritrócitos (cerca de 120 dias) (6,21).

A intensidade da glicação depende diretamente do valor da glicemia, do tempo de exposição dos eritrócitos à glicose, variando de igual forma entre diferentes doentes. Diversos artigos científicos têm confirmado a utilidade da determinação da HBA1c para avaliar o nível de controlo da glicemia nos doentes diabéticos. Deste modo, a quantificação da HBA1c é muito utilizada para monitorizar a eficácia da terapêutica aplicada a doentes com diabetes, bem como para verificar a adaptação do doente à terapia proposta (6,21).

A determinação da HBA1c, pelo c513, é baseada num imunoensaio de inibição turbidimétrica com o sangue total hemolisado (21).

Inicialmente, adiciona-se o reagente R1 (tampão/anticorpo) de modo a reagir com a glicohemoglobina, formando complexos antigénio anticorpo solúveis. Visto que o local específico para o anticorpo anti-HBA1c está presente apenas uma única vez na molécula de HBA1c, não há lugar para a formação de complexos insolúveis. É então adicionado um segundo reagente R2 (tampão/polihapteno) de modo que os polihaptenos reagem com o excesso de anticorpos anti-HBA1c, formando um complexo anticorpo polihapteno insolúvel que pode ser determinado turbidimetricamente (21).

2.2.1.7 Sta R Max

O Star R Max é um analisador totalmente automático de coagulação sanguínea.

A amostra para análise é o plasma de sangue humano com anticoagulante adicionado (Citrato de sódio), previamente centrifugado.

Os parâmetros mais estudados neste equipamento incluem o Tempo de Protrombina (TP), Tempo da Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa), doseamento do fibrinogénio e dos demais fatores da coagulação.

Hemostase e coagulação sanguínea

A hemostase baseia-se numa sequência de reações que levam ao controlo de uma hemorragia, a partir de um vaso lesado, sendo que o equilíbrio entre mecanismos coagulantes e anticoagulantes é fundamental e caracteriza todo o sistema hemostático (6).

O sangue circula de forma normal através dos vasos sanguíneos percorrendo todo o organismo. No entanto, quando existe uma lesão de um vaso sanguíneo possuímos um rápido mecanismo e equilibrado capaz de controlar a hemorragia sem que se formem grandes coágulos que comprometam a circulação sanguínea, mas que reparem a lesão e que os remova após a resolução do problema (6).

Assim, o sistema hemostático tem como finalidade a defesa do organismo preservando a integridade da circulação sanguínea, impedindo perdas de sangue que poderiam ser prejudiciais e letais para o ser humano (6).

Este processo é regulado por diferentes mecanismos, sendo ativado após ocorrer a lesão de um vaso sanguíneo. Está dependente de interações entre o endotélio vascular, as plaquetas e, ainda, entre os processos de coagulação e a fibrinólise (6).

Este sistema é composto por três fases fundamentais, para que o equilíbrio hemostático não seja comprometido (6):

- Hemostase primária;
- Hemostase secundária (coagulação);
- Hemostase terciária (fibrinólise).

Hemostase primária

Este processo está dividido em dois mecanismos principais: contração vascular e a agregação plaquetar. A contração vascular é resultante da constrição dos músculos lisos das paredes dos vasos (6).

A agregação plaquetária ocorre quando um vaso sanguíneo está danificado, ficando o tecido conjuntivo de revestimento exposto. As plaquetas aderem às fibras de colagénio do tecido conjuntivo, libertando difosfato de adenosina (ADP), catecolaminas (adrenalina) e fator plaquetar III (6).

Todo este processo faz com que as plaquetas adiram umas às outras, levando à acumulação de uma grande quantidade de plaquetas, originando assim um rolhão plaquetário. A formação do rolhão plaquetário é muito importante para manter a integridade do aparelho circulatório (6).

Hemostase secundária

Quando um vaso sanguíneo está danificado, ocorre a formação de coágulos. Um coágulo sanguíneo é uma rede de fibras proteicas (fibrina), que retém células sanguíneas. A formação de um coágulo sanguíneo depende de um conjunto de proteínas existente no plasma, chamadas fatores da coagulação. Normalmente, os fatores da coagulação estão num estado inativo não causando coagulação. Só depois de uma ferida é que são ativados (6).

A ativação das proteínas da coagulação pode ser resumida em 2 fases principais:

- 1ª fase: formação da tromboplastina tecidual;
- 2ª fase: formação da trombina sob o efeito da tromboplastina.

Via extrínseca

Esta via requer a ativação da tromboplastina tecidual (proteína transmembranar), que é libertada quando ocorre uma lesão endotelial. A tromboplastina tecidual forma um complexo com os iões de cálcio e com o fator VII, o qual é ativado formando VIIa. O complexo tromboplastina-fator VIIa converte a enzima inativa X em Xa. Esta, na presença de iões de cálcio, fosfolípidos e fator Va converte a protrombina em trombina (6).

Os valores do Tempo de Protrombina (TP) refletem a atividade dos fatores da via extrínseca (fator VII) e da via comum (fatores X, V, protrombina e fibrinogénio) do sistema da coagulação, que são sintetizados no fígado. Os resultados do TP são reportados em tempo (segundos) e sob a forma de Razão Normalizada Internacional (INR), que é calculada em função do Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) da tromboplastina tecidual utilizada, tendo como objetivo que os resultados de todos os laboratórios sejam comparáveis entre si, independentemente do tipo de reagente utilizado. Os valores do INR são utilizados para monitorizar a terapêutica com anticoagulantes orais antagonistas da Vitamina K, por exemplo, varfarina e acenocumarol (6).

A determinação do TP baseia-se no tempo de formação do coágulo de fibrina numa amostra de plasma citratado, na presença de uma tromboplastina tecidual calibrada, quando se adiciona uma quantidade adequada de cloreto de cálcio.

O INR é criado de forma a facilitar a monitorização de doentes com terapêuticas anticoagulantes, apresentando uma aplicabilidade a nível mundial. Os valores de INR são obtidos através da fórmula:

$$INR = \left(\frac{TP\ doente}{TP\ controlo} \right)^{ISI}$$

Em que ISI representa o Índice de Sensibilização Internacional da tromboplastina, que é fornecido na bula do reagente, diferindo de lote para lote (6).

Valores de referência:

- TP: 10,5-14 segundos;
- Percentagem: 70-100;
- INR: 1-1,30.

Via intrínseca

O seu início deve-se à ativação do fator XII. No interior dos vasos, este contacto ocorre geralmente ao nível de uma falha no revestimento vascular endotelial, onde o colagénio fica exposto. O fator XIIa converte o fator XI em XIa, que por sua vez converte o fator IX em IXa. O fator IXa transforma o fator X em Xa com auxílio do fator VIIIa e dos fosfolípidos plaquetários, na presença de iões cálcio (6).

Os valores do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) refletem a atividade dos fatores de coagulação do sistema intrínseco (fatores VIII e IX) e da via comum (fatores X, V, protrombina e fibrinogénio). O TTPa não é afetado pela deficiência do fator VII, sendo mais sensível aos fatores VIII e IX do que às alterações presentes na via comum. Os seus resultados são reportados em tempo (segundos) e sob a forma de razão, em função de um plasma controlo normal (6).

A determinação do TTPa tem o seu maior valor semiológico no rastreio e diagnóstico das deficiências hereditárias e adquiridas dos fatores do sistema intrínseco e da via comum, assim como na monitorização da terapêutica anticoagulante com heparina não fracionada (6).

É de salientar que o TTPa, assim como o TP, são testes de *screening* sendo que a obtenção de resultados dentro dos intervalos de referência não anula a possibilidade de existência de um distúrbio hemorrágico, pois podem ocorrer resultados normais num utente com uma deficiência parcial num determinado fator (6).

Valores de referência: 22-31 segundos.

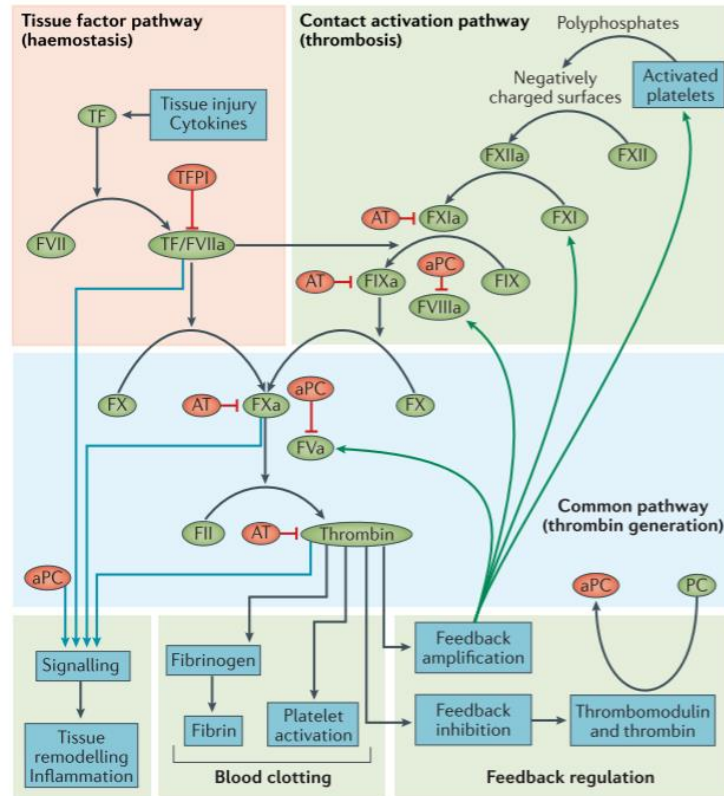


Figura 1: Modelo da cascata da coagulação (22).

Fibrinólise

O processo fisiológico conhecido por fibrinólise, tal como a coagulação, é uma resposta hemostática normal à lesão vascular, que consiste na dissolução da fibrina. É constituído por uma série de proteínas (ativadoras e inibidoras), produzidas essencialmente pelo fígado, endotélio vascular e plaquetas com o objetivo de dissolver o coágulo (6).

Este processo desenvolve-se em duas etapas (6):

1. Ativação da plasmina;
2. Dissolução do coágulo de fibrina pela plasmina.

O Tempo de trombina (TT) mede o tempo de transformação do fibrinogénio em fibrina. O ensaio consiste na adição de trombina purificada ao plasma, que catalisa a transformação, sendo o tempo de coagulação dependente da concentração e atividade do fibrinogénio. O TT é útil, como teste de *screening* da presença de heparina numa amostra. A presença de heparina inibe a atividade da trombina logo prolonga o TT, acontecendo o mesmo quando existem anomalias funcionais de fibrinogénio (disfibrinogenemia), deficiências quantitativas de fibrinogénio (afibrinogenemia, onde há uma ausência completa de fibrinogénio, e hipofibrinogenemia, provocada pela redução da concentração de fibrinogénio), níveis elevados de produtos de degradação da fibrina e níveis elevados de fibrinogénio (6).

2.2.1.8 Ortho Vision Max

O Ortho Vision Max é o equipamento utilizado para todos os testes, no âmbito da Imunohematologia feitos no laboratório, nomeadamente a determinação dos grupos sanguíneos AB0/Rh, dos fenótipos Rh- Subgrupos + Kell, do grupo sanguíneo em recém-nascidos, pesquisa de anticorpos irregulares e identificação dos anticorpos irregulares.

Determinação dos grupos sanguíneos AB0/Rh

O sistema AB0 é o sistema mais importante na prática transfusional, devido à sua imunogenicidade, sendo que a qualidade e segurança dos testes realizados devem ser estritamente assegurados. Incompatibilidades do sistema AB0 podem originar graves hemólises intravasculares, bem como outras manifestações de reações transfusionais agudas (23,24).

A classificação dos fenótipos AB0 eritrocitários correspondem à presença e/ou ausência dos antigénios A e/ou B na membrana dos eritrócitos de um indivíduo. Os indivíduos formam naturalmente anticorpos contra os antigénios (Ags) que não estão presentes nos seus próprios eritrócitos, podendo estes serem detetados no soro e/ou plasma. Estes anticorpos são, assim, naturais e regulares (23,24).

Prova globular: a prova celular ou globular tem como objetivo detetar a presença ou ausência dos Ags A/B nos eritrócitos. Para tal, são utilizados antissoros comerciais anti-A, anti-B e anti-AB que são postos em contacto com os eritrócitos. O card utilizado para a prova celular permite ainda a determinação do grupo Rh, sendo utilizado o antissoro comercial anti-D em contacto com os eritrócitos. Reações positivas com um determinado antissoro indicam que as células do indivíduo possuem o antigénio correspondente (6,23).

Prova reversa: a determinação do grupo sanguíneo AB0 exige a realização da prova reversa com plasma ou soro, a fim de confirmar a exatidão do grupo sanguíneo AB0, que foi efetuado pela prova celular. A prova reversa utiliza reagentes eritrócitos-teste de especificidade antigénica AB0 conhecida para indicar a presença ou ausência de anticorpos anti-A e anti-B (6,23).

Determinação dos fenótipos Rh- Subgrupos + Kell

Para além do Ag RhD, os outros Ags mais importantes do sistema Rh são: C, E, c e e. A determinação dos fenótipos Rh e Kell são importantes em casos de gravidez, de doentes já sujeitos a transfusão, de doentes com anticorpos irregulares conhecidos e para fenotipagem do recetor antes da transfusão (6,23).

Para determinar o fenótipo Rh testamos as células do indivíduo contra anti-soros C, c, E bem como e. Através da presença ou ausência de hemaglutinação podemos aferir que possuem ou não o antigénio correspondente e se ele está em homozigotia (CC, cc, EE ou ee) ou heterozigotia (Cc ou Ee). Para além do fenótipo Rh, é efetuado no card a determinação da presença/ausência do antigénio Kell (K), pois é um antigénio fortemente imunogénico, podendo provocar reações hemolíticas transfusionais, bem como doenças hemolíticas do recém-nascido (DHRN) (6,23).

Pesquisa de anticorpos irregulares (PAI)

O PAI é um teste que pesquisa a existência de aloanticorpos, ou seja, tem como objetivo a deteção de anticorpos anti-eritrocitários clinicamente significativos no plasma do doente. Como tal, o método vai proceder à pesquisa de anticorpos potencialmente causadores de reações transfusionais hemolíticas, de diminuição da sobrevivência eritrocitária pós-transfusional ou de DHRN. Portanto, deve ser realizado em doentes submetidos a transfusões e em grávidas. O PAI é um dos testes pré-transfusionais obrigatórios e quando detetado os aloanticorpos, devem ser identificados e deve ser selecionado o sangue sem o Ags correspondente. Aquando da realização deste, há que conhecer o diagnóstico do doente, o número de gravidezes, história de transfusões anteriores e a terapia instituída (6,23).

Esta pesquisa é realizada em meio salino (enzimático). São adicionadas células (I, II e III) e o soro do doente (6,23).

A PAI deve realizar-se:

- Como teste pré-transfusional em todos os doentes candidatos a transfusões de sangue e/ou componentes;
- No estudo de reações transfusionais, sempre que possam ser devidas a anticorpos anti-eritrocitários;
- A todas as grávidas e de acordo com protocolos estabelecidos com Obstetrícia;
- Quando é obtido uma PAI positiva, é indicativo da presença de um anticorpo irregular no plasma deste doente ou dador, o que torna necessário a realização de um outro teste denominado de Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI), onde será determinado a especificidade deste anticorpo (6,23).

Identificação dos anticorpos irregulares

Os aloanticorpos, como foi referido anteriormente, são produzidos após o contacto com Ags que o indivíduo não possui, que podem advir, maioritariamente, de transfusões sanguíneas ou, ainda, através da gravidez (6,23).

Assim, a identificação desses anticorpos torna-se importante de forma a prevenir reacções de incompatibilidade resultantes do processo de transfusão sanguínea (6,23).

Esta identificação é realizada com a adição de um painel de 11 células comerciais conhecidas que possuem a presença de diversos Ags. Compõem o painel de identificação (D, C, C^w, E, c, e, K, k, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb, Fya, Fyb, Jka, Jkb, Lea, Leb, P1, M, N, S, s, Lua, Lub, Xg) às quais é adicionado o soro do doente (6,23).

É essencial a composição do painel de células, pois perante uma reacção positiva constatamos a presença de aloanticorpos. O painel de células permite uma maior variedade de fenótipos, e, desta forma, obter um grau de probabilidade maior no que toca à identificação correta e específica do anticorpo. Aquando dessa identificação se torne inconclusiva, é enviado para o Instituto Português do Sangue e da Transplantação para posterior identificação.

2.2.2 Bioquímica Clínica

Estas áreas investigam processos metabólicos, com base em amostras de urina, fezes, sangue, líquidos cefalorraquidiano, pleural, sinovial e ascítico, onde os seus resultados refletem alterações responsáveis pelo desenvolvimento de determinadas patologias.

Múltiplos exames estão inseridos no campo da Bioquímica Clínica, tais como, avaliação de proteínas, enzimas, lípidos, minerais, eletrólitos, aspetos bioquímicos da hematologia, hormonas, vitaminas, marcadores tumorais, entre outros analitos que podem ser analisados quantitativamente e/ou qualitativamente.

Atualmente, as investigações bioquímicas estão presentes em todos os ramos da medicina e fortemente inseridas nas relações médico-doente, com a finalidade de estabelecer prognósticos e diagnósticos, monitorizar e auxiliar no tratamento.

A secção do CORE, onde se insere a Bioquímica Clínica, está organizada em quatro “partes”. O pré/pós-analítico (2 cobas p471 e p612) e 3 “linhas” do cobas (as duas primeiras “linhas” do cobas 8000 são compostas com os mesmos equipamentos (c701 e e801), diferindo em determinados testes feitos, como é o caso das drogas de abuso em que é exclusivo do cobas 2. Por fim, uma terceira linha composta pelos equipamentos c502 e e602, em que o técnico escalado da segunda linha também está responsável por esta, visto que estes equipamentos recebem uma menor quantidade de amostras (tendo analitos exclusivos, como por exemplo a cistatina C).

Objetivos

1. Identificação do tipo de produto biológico necessário à execução de cada parâmetro;
2. Conhecimento das condições exigidas para a obtenção dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos da manipulação;
3. Conhecimento das condições de separação e armazenamento dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos de manipulação;
4. Conhecimento e manipulação das metodologias aplicadas à avaliação dos metabolitos referentes ao metabolismo dos glúcidos, lípidos e lipoproteínas, proteínas e aminoácidos, ácidos nucleicos e purinas, iões, equilíbrio ácido-base, drogas terapêuticas e de abuso e exame sumário da urina;
5. Conhecimento e execução das metodologias relacionadas com a avaliação das diferentes funções fisiológicas, incluindo a endócrina;
6. Manuseamento, tratamento e interpretação dos resultados das amostras do controlo da qualidade interno e da avaliação externa da qualidade.

2.2.2.1 Cobas p471 e p612

Os cobas p471 e p612 são dois equipamentos totalmente automatizados que removem muitos dos problemas de segurança, associados ao manuseio manual das amostras e garantem que estas não sejam contaminadas, reduzindo, assim, possíveis erros.

O sistema separa cada tipo de tubo de modo que sejam enviados para os respetivos equipamentos. Prepara as diversas alíquotas, sejam para a análise dos parâmetros de bioquímica, para a imunologia, alérgenos, etc., bem como, envia as amostras para o arquivo, de modo a facilitar a sua localização e recuperação.

2.2.2.2 Cobas u6500

Os parâmetros a realizar numa urina podem ser efetuados na urina de uma só micção (urinas tipo II e urinas ocasionais) ou na urina de 24 horas.

O tempo de retenção da urina a ser colhida e o procedimento da colheita depende dos testes a serem executados.

Urinas tipo II

A análise sumária da urina tipo II engloba o exame físico e químico com a deteção e quantificação dos elementos figurados. Nomeadamente:

- Cor;
- Turvação;

- Densidade;
- pH;
- Proteínas;
- Glicose;
- Corpos cetónicos;
- Nitritos;
- Urobilinogénio;
- Bilirrubina;
- Sangue (eritrócitos/ HB);
- Leucócitos;
- Células epiteliais.

A amostra para o estudo químico e físico da urina deve ser a primeira da manhã. Trata-se de uma amostra ideal para o exame de rotina e pode ser colhida em casa pelo próprio utente (7).

As amostras no laboratório vão para o cobas p471 ou p612, de modo a serem automaticamente postas nas linhas e conseqüentemente seguirem para os equipamentos necessários. No caso das urinas, estas vão para um dos cobas u6500 para serem processadas.

O cobas u6500 é um sistema completamente automático, com leitura de código de barras, subdivido em 2 módulos, o cobas u601 e cobas u701 (25).

A análise de urina tipo II constitui um exame importante, tanto em caso de patologia urológica e renal, como também de outras patologias, uma vez que é na urina que são excretados grande parte dos metabolitos produzidos pelo corpo humano (7). Este tipo de análise é efetuado com recurso ao equipamento cobas u601 que utiliza tiras teste, as quais permitem obter resultados imediatos e semi-quantitativos relativamente à presença de determinadas substâncias na urina. Cada tira teste contém um local onde ocorre uma reação específica para cada parâmetro. O princípio de leitura das reações que ocorrem nas tiras teste é a fotometria de refletância (25).

De forma automática as amostras de urina passam para o módulo seguinte u701.

Durante a análise, a amostra é aspirada para uma cuvette descartável. É posteriormente centrifugada e a câmara digital incorporada, através do microscópio, tira fotografias de 15 campos visuais da amostra. Esta análise pretende avaliar a presença de células (leucócitos, eritrócitos e células epiteliais), microrganismos e outros parâmetros, tais como cristais, cilindros e muco (25).

Todas as imagens são avaliadas por um software de processamento de imagens de alta qualidade capaz de detetar e classificar automaticamente as seguintes partículas da urina:

- Glóbulos Vermelhos (RBC);
- Glóbulos Brancos (WBC);
- Cilindros Hialinos (HYA);
- Cilindros Patológicos (PAT);
- Células Epiteliais Escamosas (SEC);
- Células Epiteliais de Transição e Células Epiteliais Tubulares Renais (não escamosas) (NEC);
- Bactérias (BAC);
- Leveduras (YEA);
- Cristais (CRY);
- Muco (MUC);
- Espermatozoides (SPRM).

Os resultados de todos os parâmetros analíticos urinários, independentemente do tipo de amostra que for utilizado (primeira urina da manhã, colhida aleatoriamente ou durante um intervalo de tempo definido como, por exemplo, 4, 8, 12 ou 24 horas), para além de serem reportados por volume ou por tempo de colheita, também devem ser normalizados em função da concentração da creatinina (razão parâmetro/creatininúria). Os resultados expressos desta forma sofrem menos variações induzidas pelo regime alimentar e pelo estado de hidratação, são clinicamente mais fiáveis e permitem melhorar a sua exatidão e precisão a curto, médio e longo prazo, assim como a sua correlação com os de colheitas anteriores (intra-individual) e a sua comparação com os de outros indivíduos (interindividual).

Uma amostra representativa da colheita total é então enviada ao CORE para análise. É importante que os doentes sigam a sua dieta e atividades normais durante a colheita. Por isso, é essencial a recolha de toda a urina e não apenas de uma parte.

Uma urina mal colhida gera resultados errados, o que leva a tomada de decisões baseadas em resultados que não correspondem à realidade.

Diagnóstico imunológico da gravidez (DIG)

Princípio do teste de gravidez:

Este teste baseia-se na tecnologia de imunoensaios rápidos com o objetivo da deteção qualitativa da hormona da gravidez gonadotropina coriónica humana (HCG) (26).

A tira teste usa duas linhas para indicar o resultado. Está revestida com anticorpos monoclonais anti-HCG, de modo a detetar seletivamente níveis elevados da hormona. A linha controlo está revestida com anticorpos IgG anti-rato. A amostra migra ao longo da membrana, por ação capilar, para reagir com os reagentes presentes na membrana (26).

As amostras positivas reagem com o conjugado específico anticorpo-colorido de HCG para formar uma banda colorida na região da membrana da linha de teste. A ausência dessa linha colorida sugere um resultado negativo (26).

Para servir de controlo, uma banda terá sempre de ocorrer na região da linha de controlo, indicando que o volume adequado de amostra foi adicionado e a absorção da membrana ocorreu (26).

2.2.2.3 Cobas 8000 Modular Analyzer Series

O cobas 8000 Modular Analyzer Series é um sistema totalmente automatizado para análises de Bioquímica Clínica, destinado à determinação quantitativa/qualitativa *in vitro* de analitos em diversos fluidos corporais. É otimizado de modo a trabalhar usando uma combinação de elétrodos seletivos de iões (módulo cobas 8000 ISE), de análise fotométrica (módulo cobas c701) e de imunoensaios (módulo cobas e801) (27).

- O módulo cobas ISE é um sistema de eletrodo seletivo para iões para a determinação de sódio, potássio e cloro no soro e plasma (27);
- O módulo cobas c701 é um computador totalmente automatizado, para a realização de testes *in vitro* numa ampla gama de analitos. Foi projetado para usar soro/plasma, urina, fezes, sobrenadante do LCR e sangue total (27);
- O módulo cobas e801 funciona de modo a conjugar duas tecnologias, turbidimétrica e quimioluminescente, para a execução de testes *in vitro* (27);
- O cobas 8000 Data Manager gere os testes, a rastreabilidade de resultados, o armazenamento dos dados, cria relatórios, controlo da qualidade e calibração (27);
- A unidade de controlo usa uma interface gráfica do utilizador para controlar todas as funções do instrumento e é composta por um monitor de *touch screen*, teclado, rato e um computador pessoal (27).



Figura 2: Cobas 8000 e os seus módulos (ISE, dois c701, dois e801) (27).

Princípios

O sistema utiliza a tecnologia fotométrica (espectrofotometria), turbidimétrica, eletroquimioluminiscente e tecnologia seletiva de iões integrada para aplicações químicas e imunológicas para utilização clínica (27).

Potenciometria (módulo ISE)

A potenciometria é a aplicação química mais utilizada na eletroquímica e envolve a medição de uma célula potencial em condições de equilíbrio. Os métodos potenciométricos são baseados na medição de uma diferença de potencial (voltagem) entre dois elétrodos imersos numa solução onde há ausência de corrente. Estes métodos envolvem a utilização de equipamento simples e pouco dispendiosos (28):

- Elétrodo de referência;
- Elétrodo indicador/seletivo.

Os elétrodos seletivos estão predefinidos a determinar a diferença potencial de um só ião, ou seja, existe um elétrodo para o sódio, outro para o cloro e outro para o potássio. Assim, a diferença de potencial é quantificada devido à comparação com uma voltagem fixa presente no elétrodo de referência (a estabilidade desta voltagem deve-se a uma solução de cloreto de prata). Um elétrodo seletivo de ião desenvolve uma voltagem que varia com a concentração do ião ao qual responde. Desta forma, a relação entre a voltagem desenvolvida e a concentração do ião detetado, representa uma função logarítmica (28).

As técnicas potenciométricas são importantes, porque podem fornecer medições exatas de atividades, concentrações, ou atividade de coeficiente em várias espécies da solução (28). Este princípio é utilizado para a realização do ionograma.

Espectrofotometria (módulo c701)

A espectrofotometria, sendo um método que estuda a interação da luz com a concentração do material presente na amostra, é utilizada para identificar e quantificar substâncias químicas a partir da medição da absorção e transmissão de luz que passa através de uma amostra. É uma ferramenta importante e versátil. As análises podem ser quantitativas (identificação da concentração da substância) e qualitativas (identificação de um determinado analito). Esta técnica tornou-se, assim, fundamental para a determinação de diagnósticos laboratoriais. As suas principais vantagens são a sensibilidade e a seletividade. Permitem analisar um elevado número de substâncias com volumes reduzidos de amostra e rapidez dos resultados, para além dos baixos custos das análises (28).

A lei de Lambert-Beer, afirma que a concentração de uma substância é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida pelas soluções num determinado comprimento de onda (28).

Eletroquimioluminescência (módulo e801)

A eletroquimioluminescência (ECL) é uma tecnologia com uma elevada especificidade. Baseia-se em reações químicas que, a partir de um estímulo elétrico, originam luminescência, sendo utilizado um complexo de ruténio e tripropilamina na realização dos imunoensaios. A vantagem de usar estes imunocomplexos é que, após a formação do estado excitado luminescente, a emissão de um fóton regenera ao seu estado fundamental próximo à superfície do eletrodo. Portanto, uma única molécula do imunocomplexo pode participar de vários ciclos de reação de ECL para produzir vários fótons, aumentando, assim, a sensibilidade e diminuindo os limites de deteção. O objetivo desta tecnologia é a sua aplicação nos ensaios diagnósticos (29,30).

Em suma, a luminescência produzida por essa reação é diretamente proporcional à concentração do analito que se pretende determinar (29,30).

Imunoensaio Sanduíche (ELISA)

O princípio de sanduíche aplica-se a analitos de peso molecular mais elevado, tais como hormona estimulante da tiroide (TSH). Através da sua utilização, vai provocar-se uma ligação do tipo “sandwich”, em que o analito fica compreendido entre dois anticorpos – um não marcado, e outro marcado (conjugado). Após a adição de todos os reagentes, procede-se a uma lavagem que tem como finalidade remover todos os anticorpos marcados que não se ligaram ao analito. Desta forma, a concentração do analito é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida (31).

Ensaio de Ligação Competitiva

O princípio competitivo aplica-se a analitos de baixo peso molecular, tais como a triiodotironina livre (FT3). No imunoensaio competitivo verifica-se, tal como o próprio nome indica, uma competição entre os analitos e os antigénios marcados adicionados, pelos locais de ligação dos anticorpos anti-analito adicionados. A ligação do analito aos anticorpos vai provocar uma inibição da ligação dos antigénios marcados ao mesmo tipo de anticorpos, visto que os locais de ligação começam a ficar saturados. De uma forma geral, através de lavagens, os antigénios marcados que não se ligaram são eliminados da solução. Assim, a quantidade de fluorescência medida será menor, o que indica uma maior quantidade da concentração do analito, representando uma proporcionalidade indireta (31).

Ponte ELISA

Este princípio apresenta semelhanças com o princípio não competitivo (sanduíche), diferindo apenas na deteção de anticorpos e não de antigénios, como é o caso das imunoglobulinas do tipo G, imunoglobulinas do tipo M e imunoglobulinas do tipo A (32).

Manutenções

Para o bom funcionamento dos equipamentos, estes necessitam de ser submetidos a uma manutenção, que pode ser diária, semanal, quinzenal (para o cobas e801) ou mensal. A manutenção é realizada de modo a assegurar que os equipamentos se encontram em bom estado. Para tal, existe a manutenção controlada por software (conjunto de ações previamente programadas, nomeadamente as purgas) e a manutenção manual. A manutenção é executada logo pela manhã, ou seja, antes das calibrações, controlos e das amostras. Assim, o bom estado dos equipamentos é preservado contribuindo para que a determinação dos diversos parâmetros seja efetuada o mais corretamente possível (27).

A manutenção diária, consiste, na desinfecção do circuito que o próprio equipamento realiza quando lhe é introduzida essa opção (rack de limpeza), na descontaminação do equipamento, como por exemplo das agulhas de pipetagem da estação de cuvetes de reação com álcool a 70% e por guardar todos os dados das reações, reposição de reagentes quando necessários, verificar a precisão do equipamento com os respetivos controlos e esvaziar os contentores de consumíveis (27).

Para a manutenção semanal, os filtros e os copos de drenagem do módulo ISE são limpos, devido à acumulação de resíduos altamente concentrados (27).

No caso da manutenção quinzenal são adicionadas as banheiras com uma solução de limpeza, de modo a lavar os canais de esgoto (27).

Já a manutenção mensal é mais demorada, pois é necessário trocar a água do banho de incubação, tal como as próprias cuvetes de reação, trocar os elétrodos e a lâmpada do fotómetro (27).

2.2.2.4 Técnicas manuais

Folato eritrocitário (amostra em EDTA)

O ácido fólico (vitamina B9) exerce funções essenciais nos diversos processos celulares, tais como a biossíntese de ácidos nucleicos, na biogénese de grupos metil e no metabolismo dos aminoácidos (33).

A sua análise nas hemácias é comumente realizada. O ácido fólico é fixado durante a eritropoiese, sendo um marcador indicativo do seu estado nos últimos 4 meses, não sofrendo influências provenientes de alterações pontuais na alimentação. A deteção precoce das concentrações do ácido fólico previne um aumento do risco de declínio cognitivo, depressão e neuropatia, anemia megaloblástica e alguns cancros (33).

As principais causas de deficiência do analito, incluem uma desequilibrada dieta e um aumento fisiológico do seu consumo, nomeadamente na gravidez, doenças da pele (psoríase), distúrbios hematológicos e o uso de contraceptivos orais (33).

Princípio

A amostra (sangue total) é misturada com o reagente hemolizante (ácido ascórbico) e incubado durante 90 minutos à temperatura ambiente. Após o doseamento do folato eritrocitário este vai ser dividido com o valor do hematócrito em percentagem e multiplicado por 100.

$$\text{Folato eritrocitário} = \left(\frac{\text{Resultado do analito}}{\% HT} \right) \times 100$$

O hematócrito deve ser determinado previamente ao pré-tratamento da amostra (34).

Ensaio confirmatório do Ag HBs

Este ensaio tem como objetivo o diagnóstico e monitorização do vírus da hepatite B, através do marcador viral de superfície Ag HBs. Este indica se a infeção se encontra ativa (35).

O teste consiste no pré-tratamento das amostras com o reagente confirmatório e com o reagente controlo, para além de um controlo positivo à parte (35).

A preparação das amostras e do controlo positivo, depende do valor da reatividade no primeiro doseamento do Ag HBs (36).

Para confirmar um resultado positivo, o índice de cutoff (ICO) da amostra com o reagente de confirmação (valor de ICO de confirmação) foi definido para $\leq 60\%$ do reagente de controlo (o valor de controlo ICO), com um índice de corte de $\geq 0,81$ (36).

As amostras são consideradas como não reativas se o valor de ICO de controlo for $\geq 0,81$ e a razão entre o valor do ICO confirmatório e o ICO do controlo for $> 60\%$. Se o ICO do controlo for $< 0,81$ e a relação fosse $\leq 60\%$, então a amostra era considerada indeterminada. Se a razão fosse $> 60\%$ e o ICO controlo $< 0,81$, o valor era inválido. A percentagem de neutralização foi obtida pela equação:

$$\left\{1 - \frac{ICO \text{ confirmatório}}{ICO \text{ controlo}}\right\} \times 100 \quad (36).$$

2.3 Fatores que podem interferir nos resultados das análises

- Hemólise: corresponde à lise dos eritrócitos e libertação do seu conteúdo (HB, iões e outras substâncias);
- Icterícia;
- Lipemia;
- Temperatura;
- Seleção/proporção/contaminação de anticoagulante.

2.4 Química Analítica + RIA

O laboratório onde se insere o módulo de Química Analítica e a RIA divide-se em absorção atómica (SHIMADZU AA-7000 e AA-6800), IPC-Massas (Kibion Dynamic), Massas (Gastro CH4ECK, IRAffinity-1S, balança), validação, RIA (1470 WIZARD Gama Counter e Immunolite) e o laboratório em si. Este é onde se preparam as amostras e onde se encontram os equipamentos de HPLC.

O trabalho na Química Analítica é organizado segundo a data de saída dos resultados. Isto é, a semana de trabalho é planeada consoante as análises com as datas de entrega mais próximas.

São diversas as análises feitas no departamento de Química Analítica e RIA sendo as mais requisitadas: selénio, chumbo, alumínio, crómio, vitamina B1, vitamina B6, vitamina A+E, Cálculos renais, teste respiratório de *Helicobacter pylori*, AVM (ácido vanilmandélico, ácido homovanílico, ácido 5-hidroxicinacético), teste respiratório com sobrecarga de lactose, glucose e lactulose (intolerância alimentar), testosterona livre, 17α -hidroxiprogesterona e aldosterona.

As amostras utilizadas incluem amostras de soro, urina de 24 horas acidificadas, cálculos renais, sangue total e de sangue de animal.

2.4.1 Química Analítica

Absorção atômica de grafite

Para o doseamento dos metais (selênio, chumbo, alumínio, crómio) são utilizados dois equipamentos: o AA- 7000 Shimadzu e o AA- 6800 Shimadzu, ambos com a tecnologia de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

A amostra é injetada no forno de grafite de modo que seja sujeita a diferentes temperaturas para provocar a dessolvatação (remoção do solvente da amostra) até à atomização do analito. Os átomos livres vão absorver a luz emitida pela lâmpada de cátodo oco e são excitados (mudanças para os níveis de energia superiores) (37,38). A quantidade de absorção segue a lei de Lamber-Beer (a absorção por unidade de espessura do meio é proporcional à concentração das partículas absorventes) (28).

Um dos metais mais doseado é o selênio. Este tem um papel importante no nosso metabolismo. A sua deficiência pode ter graves consequências, seja a curto como a longo prazo, nomeadamente cardiomiopatia, doença cardiovascular, infertilidade masculina e uma resposta imune débil. No entanto, consoante a quantidade presente no organismo pode ser interpretado com um agente tóxico. Altas concentrações de selênio podem levar a irregularidades na pele, cabelo e a sintomas gastrointestinais ou neurológicos (39).

Para o doseamento do analito, o equipamento adiciona uma modificação da matriz de paládio a cada alíquota, sendo que apenas são injetados 10 microlitros da solução (amostra, mais o modificador de paládio).

HPLC- Doseamento da Vitamina B6

O termo vitamina B6 inclui três derivados da piridina, nomeadamente, piridoxal, piridoxamina e piridoxina. Estes são fosforilados e desfosforilados no fígado a fosfato piridoxal (PLP, forma ativa da vitamina B6). A sua produção é regulada e mantém-se constante, sendo libertada e ligada à albumina para o plasma. O PLP vai atuar como um cofator para diversos processos metabólicos (40).

O PLP provém da alimentação, através da ingestão de carne, produtos lácteos, feijões ou vegetais. Baixas quantidades de vitamina B6 têm sido associadas ao uso de contraceptivos orais, drogas, tabaco, alcoolismo e diabetes, o que leva a um aumento de risco de doenças cardiovasculares (40).

De modo a dosear a vitamina B6 é utilizada a tecnologia de HPLC. A cromatografia é um processo que permite a fragmentação de uma mistura de compostos em consequência das diferentes velocidades a que eles se movem, através de uma fase estacionária, sob influência de uma fase móvel. A designação de cromatografia líquida deve-se ao facto de se usar uma fase móvel líquida. Neste caso, a fase estacionária vai estar no interior de uma coluna (41).

Cálculos renais

Urolitíase é uma perturbação do trato urinário e ocorre devido à formação de cristais e/ou cálculos que se agregam de forma sólida, sendo denominados como cálculos urinários. Estes podem ter como origem fatores ambientais, formação de cálculos urinários em idade pediátrica ou distúrbios metabólicos associados (42).

Para a análise dos cálculos urinários é utilizada a tecnologia de espectroscopia de infravermelhos (FTIR) no equipamento IRAffinity-1S, após a devida preparação da amostra e sua análise preliminar (número de cálculos, descrição, tamanho, o tipo, peso, dureza).

A espectroscopia de infravermelho baseia-se nos movimentos dos átomos numa molécula, ou seja, as suas vibrações. Desta forma, a espectroscopia irá detetar a radiação que é absorvida através das ligações vibracionais. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, funciona como uma alternativa às análises químicas de rotina. Esta tecnologia possibilita a sua aplicação tanto qualitativa, como quantitativamente. A aplicação qualitativa é vista como um *fingerprint* da amostra em estudo, o que permite a sua identificação. Estes tipos de equipamentos têm por base um interferómetro de Michelson (43).

Teste respiratório com sobrecarga de lactose, lactulose e glucose

Gastro CHECK é um equipamento para medir os níveis de hidrogénio, metano e oxigénio (O₂) numa amostra de expiração, em resposta a um determinado carboidrato, aplicando o método de referência eletroquímico associado a infravermelhos (44).

O hidrogénio e o metano são produzidos no lúmen do intestino pelas bactérias colonizadas, em resposta à digestão de carboidratos. Assim que os gases produzidos entram na circulação sanguínea são transportados até aos alvéolos onde podem ser detetados no ar expirado. A sua medição em partes por milhão (ppm) revela uma intolerância ou mal absorção dos carboidratos ou um crescimento excessivo de bactérias (44).

A medição do O₂ serve para corrigir quaisquer testes que não obtenham uma boa amostra expiratória. Isto é, se houver mais de 14% de O₂ na amostra é aplicado um fator de correção (44).

Para a sobrecarga de lactose são fornecidas diferentes quantidades, consoante o peso do doente. Até 5kg, a lactose administrada é de 5 g, com 10 kg são 10 g, com 15 kg são 15 g e partir dos 25 kg são 25 g. Na sobrecarga de lactulose e glucose (10 e 50 gramas, respetivamente) a quantidade a administrar é a mesma, independentemente do peso do doente (44).

A preparação do doente inclui jejum e uma abstinência no dia anterior do seguintes alimentos: cereais, leite e derivados, frutos e derivados, vegetais, nozes e leguminosas.

Tabela 8: Intervalos de tempo dos protocolos dos testes.

Teste	Frequência do teste (minutos)	Amostras
Lactose	0, 15, 30, 60, 90, 120	6
Lactulose	0, 15, 30, 45, 60, 90	6
Glucose	0, 15, 30, 45, 60	5

Helicobacter pylori

Para realizar o teste Helicobacter *INFAI* é utilizado o equipamento Kibion Dynamic. Este utiliza a tecnologia de espectroscopia de infravermelhos não dispersiva (NDIF) que vai medir as concentrações dos gases aos quais os detetores óticos-acústicos são sensíveis. Especificamente para os $^{12}\text{CO}_2$ e $^{13}\text{CO}_2$ e para a determinação da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -isótopo (45).

As concentrações de $^{13}\text{CO}_2$ no gás expirado estão na faixa de 50 a 500 ppm, onde $^{12}\text{CO}_2$ está em concentrações de 0,5 a 4,5 % do volume total (45,46).

O carbono-13 pode ser detetado no dióxido de carbono expirado dos pulmões. Então, é dada uma refeição teste líquida em jejum ao doente.

O teste começa pela expiração do ar para os tubos marcados com o tempo 0. De seguida, é dada a refeição teste (200 mililitros (ml) de sumo de laranja 100% ou 1 g de ácido cítrico em 200 ml de água) e a solução teste (^{13}C -ureia). 30 minutos após a ingestão existe nova expiração para os tubos marcados com os 30 minutos (45).

Estas amostras vão ser analisadas, de modo a comparar a quantidade de carbono 13 no dióxido de carbono presente na respiração. Um expressivo aumento sugere uma infeção causada pela bactéria *Helicobacter pylori* no estômago (45).

2.4.2 RIA

O equipamento 1470 WIZARD Gama Counter é utilizado para as análises de RIA. Tem como base os princípios básicos da radioatividade.

Os testes realizados funcionam através de isótopos radioativos de modo a revelar uma reação antigénio-anticorpo, sendo que estes podem ser imunoensaio não-competitivo ou competitivos, onde se obtêm resultados quantitativos em amostras de soro. Para a referida metodologia, ao mais requisitados a quantificar são: a testosterona livre, 17 α -hidroxiprogesterona e aldosterona. (47–49).

Princípio:

Os radioisótopos são isótopos cujo nuclídeos têm o mesmo número atómico, diferente número de massa, mas com propriedades químicas iguais (48,49).

São átomos com núcleos instáveis. No geral, um núcleo instável tem uma tendência natural de alcançar a estabilidade através de transformação espontânea (a combinação nuclear dos prótons e neutrões é que fornece a estabilidade ao núcleo dos átomos), por um processo conhecido por decaimento radioativos (perda espontânea de massa e emissão de energia sob a forma de radiação) (48,49).

O I^{125} (iodo) é o mais utilizado, pois tem uma semivida relativamente longa (aproximadamente 60 dias), emite fotões de baixa energia suficiente para ativar os detores de radiação gama (47–49).

Ensaio competitivo

A amostra em estudo compete com um análogo do analito marcado com o radioisótopo de eleição, pela ligação ao anticorpo anti-analito que reveste as paredes do tubo (48,49).

O sinal detetado é indiretamente proporcional à concentração do analito presente na amostra (48,49).

Ensaio não competitivo

A amostra vai a incubar com o tubo revestido com o anticorpo específico para o analito e um conjugado de anticorpo marcado com I^{125} . O sinal a ser detetado é diretamente proporcional à concentração do analito presente na amostra (48,49).

17 α -hidroxiprogesterona

A 17 α -hidroxiprogesterona é uma hormona esteroide que é produzida a partir da 17 α -hidroxipregnenolona nas suprarrenais, ovários, testículos e na placenta. Esta ainda vai ser hidrolisada de modo a ser produzido cortisol (50).

O soro é a amostra mais utilizada para o doseamento de 17α -hidroxiprogesterona no auxílio ao diagnóstico de hiperplasia adrenal congénita. A patologia deve-se à supressão de enzimas. Esta deficiência aumenta a ACTH, provocando a hiperplasia adrenal, havendo um aumento dos precursores esteroides. Também está associada na deteção da hiperplasia benigna da próstata e carcinoma da próstata (a 17α -hidroxiprogesterona encontra-se abaixo dos valores normais) (50).

Princípios do método:

Uma quantidade fixa de I^{125} esteroide marcado compete com o esteroide a ser medido presente na amostra ou no calibrador por uma quantidade fixa de locais de ligação aos anticorpos imobilizados na parede de um tubo de poliestireno. Nem a extração, nem a cromatografia são necessárias devido à alta especificidade dos anticorpos revestidos. Após 3 horas de incubação a 37°C , uma etapa de aspiração encerra a reação de competição. Os tubos são então lavados com 3 ml de solução de lavagem e aspirados. Uma curva de calibração é traçada e as concentrações de 17α -hidroxiprogesterona das amostras são determinadas por interpolação de dose a partir da curva de calibração (50).

Valores de referência:

Homens: 0,59-3,34 ng/ml; Mulheres na fase folicular: 0,11-1,08 ng/ml; Mulheres na fase lútea: 0,95-5 ng/ml; Recém-nascidos: <2,67 ng/ml (50).

2.5 Genética

O serviço de genética no JCS é dividido nos setores de Citogenética (cariotipo) e de Biologia Molecular, no entanto partilham diversas áreas, tais como a receção/triagem das amostras, computação, validação e arquivo.

A Citogenética engloba a Citogenética Pré-Natal, Pós-Natal, Citogenética Molecular e Rastreio Pré-Natal de Síndrome de Down e Defeito do Tubo Neural. O setor de Biologia Molecular abrange a Genética Molecular e Investigação de Paternidade, onde a metodologia de trabalho é baseado na *polymerase chain reaction* (PCR), seja em tempo real ou convencional.

As áreas onde é realizado trabalho de bancada incluem os laboratórios de cultura de tecidos, laboratórios de espalhamento e colorações, extração de DNA, pré-PCR, adição de A.D.N e termocicladores.

2.5.1 Citogenética

A análise citogenética tem como objeto de estudo os cromossomas (estrutura, morfologia, função e patologias). Atualmente, divide-se em citogenética convencional e citogenética molecular/citogenómica. Os cromossomas estão localizados em todas as células nucleadas, contendo DNA (ácido desoxirribonucleico), proteínas histónicas e não histonas, sendo que cada célula tem 23 pares de cromossomas. A molécula de DNA contém cromatina que é a unidade básica dos cromossomas. Cada cromossoma é composto por dois cromatídeos irmãos, um centrómero e telómero. Os cromossomas são obtidos a partir de diversos tecidos, sejam em biópsias de vilosidades coriónicas, líquido amniótico ou sangue periférico (linfócitos) (51).

Para o seu estudo é necessário previamente estimular a cultura dos tecidos. Na JCS é realizada através dos protocolos de cariótipo de linfócitos de sangue periférico com bandas de alta resolução (sincronização com metotrexato, timidina e calcemida) e cariótipo fetal no líquido amniótico e vilosidades coriónicas, de modo que estejam no ponto máximo da sua condensação (durante a metáfase), para se proceder ao seu espalhamento e a sua consequente análise. Para um bom espalhamento dos cromossomas, seja *in situ* ou manualmente, as condições atmosféricas têm de estar propícias para tal. Caso contrário, pode haver uma dispersão dos mesmos deficiente e perde-se qualidade na definição do bandeamento (51). Desta forma, as condições foram otimizadas para uma temperatura de 25C° e uma humidade relativa de 50%. Por fim, as lâminas são coradas, observadas em cariogramas e analisadas (cariotipagem cromossómica de bandas G) (51). As bandas visualizadas no cariograma formam um padrão próprio de cada cromatídeo, ajudando na avaliação de alterações estruturais com uma capacidade de resolução de 5 a 10 Mb (51).

Sendo o objetivo da citogenética o diagnóstico das anomalias cromossómicas, tanto numéricas, como estruturais, estas ainda podem ser classificadas como constitutivas, presentes logo ao nascimento ou adquiridas, surgindo ao longo da vida do indivíduo (51).

Anomalias numéricas

Referem-se a alterações cromossómicas resultantes da variação do número de cromossomas sexuais e autossomais. Estas alterações são divididas em:

- Aneuploidias: perda ou ganho de um número de cromossomas inferior ao número haplóide humano. São formadas duas células, uma com uma cópia extra do cromossoma (trissomia) e outra com uma cópia ausente do cromossoma (monossomia) (51);

- Euploidias ou poliploidia: quando o organismo possui mais de dois conjuntos haploides de cromossomas, ou seja, variações em que o número de cromossomas é múltiplo do número haplóide. Uma célula com três conjuntos haplóides ($3n$) é chamada de triploide, caso tenha quatro conjuntos ($4n$) é tetraplóide, e assim por diante ($5n$).

Anomalias estruturais

As anomalias estruturais podem ocorrer de novo ou podem ser herdadas. Originam-se por quebras cromossómicas com posterior perda, ganho ou rearranjo de segmentos cromossómicos ou por *crossing-over* desigual, nomeadamente: translocação, deleção, cromossoma em anel, duplicação, inversão, isocromossoma ($5n$).

Microarray

A tecnologia de microarray avalia o número de cópias dos genes através da hibridização com sondas compartilhadas numa base de dados. É utilizada como o método de diagnóstico pré-natal de primeira linha, após a identificação de malformações congénitas estruturais na ecografia pré-natal. Essa abordagem pode descobrir, com precisão, o número e as anormalidades estruturais dos desequilíbrios cromossómicos, nomeadamente *copy number variations* (CNV; benigno), *copy number change* (CNC; significado desconhecido) e *copy number alteration* (CNA; maligno com consequências fenotípicas) microscópicas ou submicroscópicas (50 kb) ($5n$).

2.5.2 Biologia molecular

As análises mais pedidas são:

- α -1 antitripsina;
- HLA-B27;
- Fibrose quística (procura da mutação no gene CFTR);
- Hemocromatose;
- Fator V Leiden (mutação R506Q);
- Detecção de aneuploidias;
- Pesquisa de microdeleções no cromossoma Y;
- Detecção da mutação V517F no gene JACK2;
- Estudo molecular do Síndrome de Gilbert.

A biologia molecular utiliza o DNA genómico total sendo possível detetar mutações que estejam associadas a diversas patologias ($5n$).

Extração de DNA

Para a extração do DNA é, geralmente, utilizado um sistema automatizado para a purificação de ácidos nucleicos, usando tecnologia de partículas de vidro magnéticas, a partir de vários tipos de amostras (53).

Alfa-1 antitripsina

A alfa-1 antitripsina (AAT) é uma proteína de fase aguda positiva, produzida no fígado. Quando se encontra em baixas concentrações, aumenta o risco de desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crónica e cirrose hepática. A deficiência da proteína AAT é caracterizada por mutações no gene *SERPINA1* (*SER*ine *Proteinase I*Nhibitor A1; locus PI), o que leva a baixos níveis circulantes da mesma. Os alelos mais comuns são PI*M (variante normal), PI*S e PI*Z (mutações mais prevalentes) (54).

A nomenclatura M, S e Z é referente à velocidade de migração durante a eletroforese. A variante M migra numa velocidade média, S é mais lenta e a Z é a que migra mais devagar (54).

Os genótipos com caracterização da doença são o SZ e ZZ, tendo em conta que a homozigotia do alelo Z apresenta um fenótipo clínico mais grave (54).

A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real. Esta técnica segue os mesmos princípios básicos de um PCR convencional (desnaturação, *annealing* e extensão) (55,56).

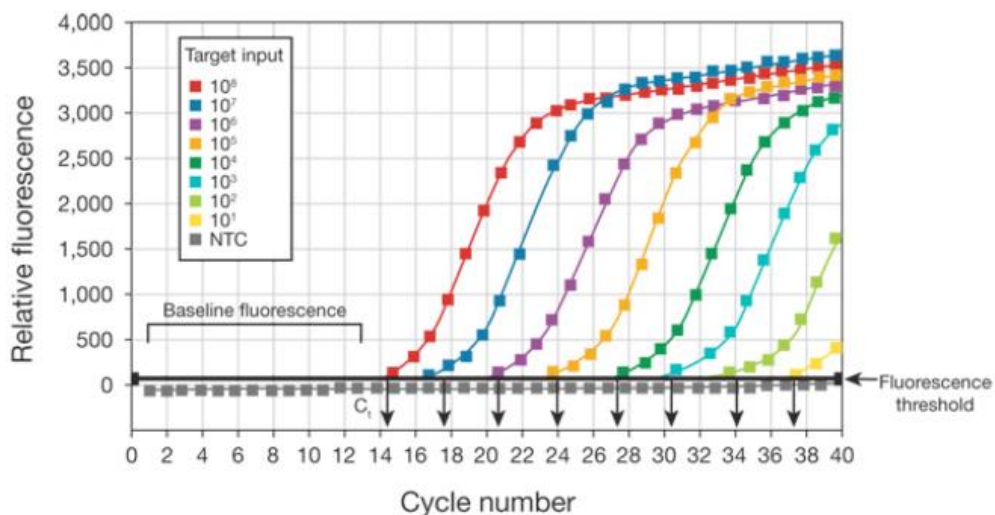


Figura 3: Representação gráfica de um PCR em tempo real (57).

A linha de base separa o ruído da reação enquanto não há alterações significativas no sinal de fluorescência (55,56).

A deteção do sinal vai ser obtida através do número de ciclos necessários de amplificação para a deteção do sinal de fluorescência (CT). Este reflete a quantidade inicial de DNA na amostra, pois é inversamente proporcional. Quanto maior a quantidade de DNA, menor serão os ciclos necessários (55,56).

A última fase da técnica é estacionária, onde se dá o efeito *plateau*. Este é mais rapidamente obtido, quanto maior for a quantidade e qualidade da amostra (55,56).

2.6 Fase Pós Analítica

Esta fase desenvolve-se em volta de todo o processo de gravação, validação dos resultados obtidos na fase analítica e a conservação das amostras. Esta fase ocorre após a verificação do processamento de todos os parâmetros analíticos da amostra. É particularmente importante, porque é necessário que haja toda uma aquisição prévia de conhecimento científico acerca dos analitos em questão, para assim conseguir evidenciar, se os resultados obtidos se encontram em concordância com o diagnóstico e historial clínico do doente.

A conservação das amostras devem obedecer às regras de segurança e ambiente em vigor, com o propósito de prevenir a contaminação do ambiente e dos colaboradores, assim como manter a integridade da amostra. As amostras e respetivas alíquotas já processadas têm de ser acondicionadas num espaço refrigerado de modo que a temperatura esteja compreendida entre os 2 a 10^o C. Consoante a natureza da amostra e os parâmetros no seu processo esta vai ser guardada durante um determinado período.

3. Controlo da qualidade

O controlo da qualidade é um conjunto de ações que se destinam a assegurar a qualidade dos resultados obtidos. Destina-se fundamentalmente ao controlo da reprodutibilidade dos métodos e dos resultados. Além disso, vigia a incidência dos erros fortuitos.

Os resultados do controlo da qualidade, nas áreas do CORE, são registados em Cartas de Controlo e devem reger-se segundo as regras de Westgard enviadas para o Unity Real Time, para além da margem médica mais restrita. Estas regras definem limites de aplicabilidade do método (desvio padrão) e podem usar-se para detetar erros sistemáticos ou aleatórios.

Controlo da qualidade interno (CQI)

O CQI tem como objetivo a verificação e monitorização da estabilidade de desempenho dos ensaios analíticos de modo assegurar a qualidade, a consistência da utilidade clínica dos resultados ao longo do tempo, tal como minimizar os riscos associados com erros da fase analítica.

Os controlos da qualidade são processados como se de uma amostra se tratasse, podendo ser diariamente, ou em casos de parâmetros que são pouco comuns, realizados aquando da requisição da análise desses mesmos parâmetros, avaliando a precisão dos ensaios. Como é o caso de determinados fatores da coagulação (tais como o fator VIII) e da avidéz do citomegavírus.

O CQI nos ensaios quantitativos são determinados os erros máximos admissíveis, como o erro total máximo admissível e a imprecisão máxima admissível, tendo em conta o impacto dos resultados na saúde dos doentes e estarem em linha de conta o estado de arte/desempenho estável do ensaio e a relação custo/benefício. Para os ensaios qualitativos, é aplicado o grau de concordância com os resultados referenciados como corretos.

Para a realização deste controlo, utilizam-se fluidos comerciais de referência. Estes têm uma concentração conhecida e um intervalo entre o qual a concentração pode variar.

Caso não se possam validar os controlos, têm de ser aplicadas medidas corretivas, dependendo do tipo de erro que está associado à análise do controlo. É obrigatório o registo do problemas detetado, bem como o processo de identificação e correção.

Na Bioquímica Clínica são utilizados dois controlos diferentes. Uns da casa comercial (Roche) e da Bio rad.

Controlo da qualidade externo (CQE)

No CQE, os laboratórios que participam recebem amostras para analisar, cujos valores são desconhecidos, determinando a exatidão dos resultados. Estes são posteriormente enviados às entidades competentes para uma comparação estatística com outros laboratórios.

Os indicadores de desempenho utilizados para identificar a presença de falhas, erros ou desvios em relação a um determinado valor alvo são o BIAS%, índice do desvio padrão e o grau de concordância requerido em relação aos resultados esperados.

Caso sejam detetados desvios significativos ou falhas é necessário identificar as causas, aplicar ações preventivas para corrigir e ou evitar as falhas.

O JCS mantém estabelecido um CQE com diversas entidades, nomeadamente:

- INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge);
- UK NEQAS (National External Quality Assessment Schemes).

- RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme).

Higiene, Segurança e Qualidade no Trabalho

O JCS segue e consolida as normas e Decretos-Lei para uma melhoria contínua no trabalho seja através da implementação de medidas de higiene, segurança e qualidade direcionadas tanto para os clientes, como para os colaboradores.

A política da qualidade no JCS insere-se na focalização do serviço prestado ao cliente, na monitorização de programas da qualidade, na formação e qualificação de os colaboradores, na parceria com os clientes institucionais e fornecedores, prevenção dos riscos e no cumprimento dos requisitos, assim como na otimização dos recursos, aliada às boas práticas.

Os serviços prestados têm ainda implementado um Sistema da Gestão de Qualidade que se encontram certificados pela norma NP EN ISO 9001.

A gestão e tratamentos de resíduos têm como objetivos assegurar a qualidade e proteger a saúde pública e ambiental. Para tal, a JCS acompanha as leis em vigor de modo a qualificar os diversos resíduos produzidos, assim como no seu tratamento e transporte.

4. Calibrações

Para se realizar uma calibração são utilizadas amostras de matriz e composição bem definidas, adaptadas aos métodos utilizados e destinadas à obtenção de pontos de referência em unidades padronizadas, para as diferentes técnicas analíticas. Os calibradores são amostras cujos valores foram previamente determinados por um método definitivo ou de referência. Estas são processadas e, através dos valores das absorvências obtidos e das concentrações conhecidas, é traçada uma curva de calibração.

Recorre-se à calibração quando é feita uma mudança de reagente com novo lote, quando os controlos estão fora dos limites aceitáveis, sempre que haja uma tendência, ou ainda, quando se considera pertinente. Deve-se ter em conta que uma calibração só é considerada totalmente válida quando os resultados dos controlos (processados posteriormente) se encontram dentro dos limites aceitáveis.

5. Conclusão

Ao chegar à etapa final deste estágio, posso concluir que ao longo dos meses foi-me possível assimilar conhecimentos práticos e teóricos que complementam/reforçam, de forma importante, os anteriormente adquiridos. Acredito que desempenhei as minhas funções com responsabilidade e resiliência.

Ao longo deste período, esforcei-me para aprender tudo aquilo que era necessário para a elaboração das várias técnicas, assim como para fazer todo o trabalho corretamente.

Consegui também, aprender com os erros, tendo sempre em consideração o que me era sugerido para melhorar a forma de realização das tarefas. Desenvolvi, ainda, a capacidade de trabalhar em equipa.

Em face do exposto, considero que os objetivos deste estágio foram atingidos, sendo este uma mais-valia para a minha formação.

Parte II

6. Introdução

O citomegalovírus (CMV) foi comprovado como o principal agente de infeção viral congénita, afetando entre 0,4 e 2,2% dos nascimentos a nível mundial. Até 10% apresentam sintomatologia (por exemplo icterícia e hepatoesplenomegália). A sua morbilidade (definitiva ou temporária), tal como a mortalidade provocada pelo vírus, são identificadas como um problema de saúde pública. Esta, deve-se ao número de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura, custos envolvidos no seu controlo, tratamento das suas complicações e ao longo da sua escolaridade (58–60).

A prevalência da infeção varia consoante as demais características, tais como as condições socioeconómicas, idade, etnia, o frequente contacto com crianças, atividade sexual e da preexistência de anticorpos maternos contra o vírus (59,61,62).

De acordo com o Segundo Inquérito Serológico Nacional (2003-2006), a taxa de seropositividade para a população portuguesa dos 15 até aos 44 anos de idade varia de 71 e 84% (61).

Nos países desenvolvidos, até 85% das mulheres em idade fértil têm anticorpos contra o CMV. Pelo contrário, nos países em desenvolvimento, a prevalência do vírus pode chegar aos 100%. A seropositividade ao nascimento, na União Europeia e no Estados Unidos da América, abrange, sensivelmente, 60 mil recém-nascidos (RN) a cada ano (58,62).

O CMV, pertencente à família *Herpesviridae*, é membro da subfamília *Betaherpesvirinae*, fazendo parte do género *Cytomegalovirus*. Como tal, apresenta características de um herpes vírus, tais como o genoma ser ácido desoxirribonucleico (DNA) de dupla cadeia linear não segmentado, com invólucro. Possui uma cápside de simetria icosaédrica, é específico da espécie humana, permanece latente no organismo (nomeadamente nas células mononucleares) após a infeção primária, com replicação lítica, não apresenta variação sazonal e é responsável por infeções endémicas (61,63,64).

O CMV tem como via de transmissão os contactos interpessoais, tais como contacto direto das mucosas com determinados fluidos corporais infecciosos, nomeadamente saliva, urina, lágrimas, secreções vaginais, sémen e secreções orofaríngeas ou ainda, por meio de transplantes, transfusões ou transmissão vertical (64).

A transmissão vertical tem origem *in utero* provocando uma infeção congénita. Caso seja durante o parto esta é uma infeção perinatal (mais frequente). Após o nascimento, a infeção ainda pode advir por intermédio da amamentação do leite materno infetado (61).

A transmissão durante a gravidez, induzindo uma infeção congénita, pode ter derivado da falta de imunidade da mãe. No entanto, mesmo pré-existindo imunidade contra a infeção, a transmissão ainda pode acontecer, seja por reativações, seja pela aquisição de novas estirpes virais. Para as grávidas imunizadas, o risco de transmissão intrauterina é bastante reduzido, sensivelmente, 0,5 a 2% (62,65).

Durante a gravidez, a infeção primária materna (primeiro contacto) do CMV subsiste um risco substancial, de até 40%, da transmissão viral através da placenta ao feto. A probabilidade da transmissão materno-fetal (TMF) agrava com o aumento da idade gestacional (30%, 38% e 72% para o primeiro, segundo e terceiro trimestre da gestação, respetivamente). Em contrapartida, a idade da grávida influencia o risco da transmissão congénita. As grávidas mais novas apresentam um maior risco de transmitirem a infeção para o feto, seja como infeção primária ou não (65,66).

O risco da transmissão vertical varia consoante a infeção congénita resultar de uma infeção primária ou não primária (reinfeção e reativação) (67).

7. Manifestações Clínicas da Infeção Congénita

A infeção congénita pelo CMV é a mais comum entre as infeções virais. Pode ser potencialmente fatal ou não manifestar quaisquer sinais ou sintomas ao nascimento. Esta dicotomia tem um papel importante no prognóstico da criança, visto que os sintomáticos possuem um maior risco de sequelas no desenvolvimento do foro neurológico (66,68–70).

As infeções congénitas iniciam-se com a virémia na mãe com disseminação do vírus para a placenta. O agente patogénico vai-se replicar provocando lesão endotelial capilar. A infeção e inflamação da placenta podem induzir insuficiência placentária, o que pode provocar a morte do feto, um atraso no crescimento intrauterino ou microcefalia. Através desta infeção há uma propagação do vírus para os órgãos alvo, designadamente o fígado, baço, cérebro, olho ou ouvido (cóclea) (66,68–70).

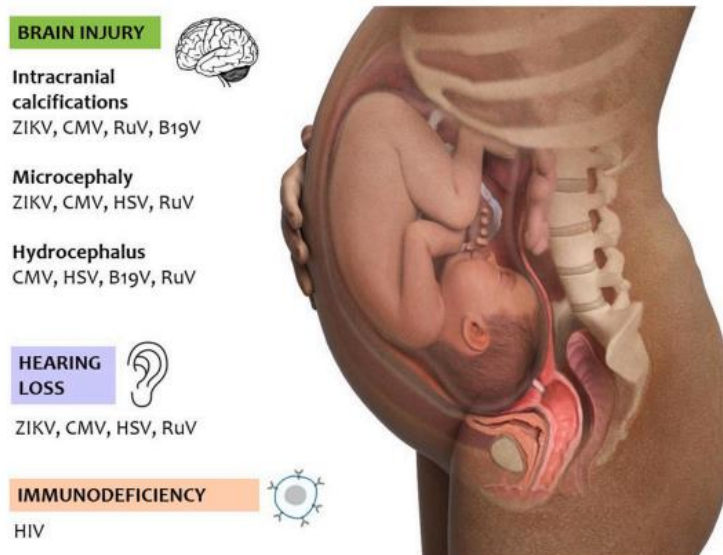


Figura 4: Potenciais alvos de infecções virais congênitas (71)

Dos RN infetados, cerca de 90% são assintomáticos e os remanescentes apresentam manifestações clínicas. A enfermidade provocada pelo vírus compromete diversos órgãos com uma propensão para o sistema nervoso central (SNC) e para as células mononucleares. As manifestações clínicas mais comuns incluem, mas não se limitam a (Tabela 9) icterícia, hepatoesplenomegália, microcefalia, calcificação cerebral, trombocitopenia, erupção cutânea, atraso no desenvolvimento do SNC, sendo a mais característica a perda auditiva neuro sensorial (PANS) (68–70). A infecção pelo CMV pode ser confundida com outras doenças que também provocam atrasos no neuro desenvolvimento, microcefalia e malformações. Deste modo, é crucial diagnosticar precocemente a infecção (72).

De modo a melhorar o prognóstico das crianças infetadas congenitamente (infecção intrauterina) pelo CMV, é necessário aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos patogênicos da mesma (71).

Um das vias que se tem desenvolvido é a compreensão do papel da placenta e de como a sua insuficiência influencia a patogênese da infecção. Já se descobriu que a infecção pelo CMV replica-se nos citotrofoblastos (a camada interna dos trofoblastos vilosos, os quais têm um papel importante na formação da placenta). A infecção vai interferir na diferenciação dos citotrofoblastos, o que vai inibir o desenvolvimento de novas vilosidades, provocando edema/fibrose placentário, resultando, assim, no déficit de oxigênio transportado, assim como de substâncias nutritivas para o feto. Como consequência, provocará um atraso no desenvolvimento fetal. No entanto, também existem casos em que a transmissão vertical viral não ocorre, embora haja insuficiência placentária (71).

Existem diferentes mecanismos que vão provocar danos na placenta, nomeadamente (71):

- Um débil desenvolvimento da matriz extracelular, com uma expressão diminuta das proteínas integrinadas, impedindo a adesão celular e a capacidade de invasão tecidual;
- Diminuição da atividade das metaloproteinases de matriz mediado pela IL-10, o que resulta numa expressão reduzida dos antígenos leucocitários humanos nos citotrofoblastos;
- A ativação dos recetores por proliferadores de peroxissoma interfere nas funções dos citotrofoblastos.

As manifestações clínicas da infeção congénita podem ser categorizadas ao nascimento ou tardias. Estas são descobertas pelos achados clínicos e laboratoriais que podem ser detetadas, tanto no RN, como com meses ou até anos após o nascimento do bebé infetado (66).

Laboratorialmente, as crianças sintomáticas demonstram uma correlação entre a infeção sintomática com o sistema hepatobiliar, que inclui hiperbilirrubinémia conjugada, trombocitopenia e transaminases elevadas. O pico da bilirrubina e das transaminases é atingido nas duas primeiras semanas de vida e tendem a manter-se elevadas por muitas semanas. A trombocitopenia atinge o seu máximo logo na segunda semana e estabiliza entre a terceira e quarta semanas (69).

Tabela 9: Principais características clínicas e laboratoriais em crianças infetadas congénitamente pelo CMV (69).

Finding	Infants With Abnormality, %
Clinical findings	
Petechiae	76
Jaundice	67
Hepatosplenomegaly	60
Microcephaly	53
Intrauterine growth retardation	50
Chorioretinitis/optic atrophy	20
Purpura	13
Seizures	7
Laboratory findings	
Elevated AST (>80 U/L)	83
Conjugated hyperbilirubinemia (direct bilirubin >4 mg/dL)	81
Thrombocytopenia (<100 000/mm ³)	77
Elevated CSF protein (>120 mg/dL)	46

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; CSF, cerebrospinal fluid.

^a Data from Boppana et al [5].

Por sua vez, 90% dos RN infetados congénitamente não apresentam sintomatologia. Tais RN vão ter uma vida, nitidamente, mais confortável em relação aos sintomáticos (68,69,72,73).

Para além da infeção congénita ser a principal causa não genética de PANS, também é a principal causa viral de atraso do neuro desenvolvimento (68,69,72–74). Entre 8 e 10% dos infetados vão sofrer consequências a médio-longo prazo, quer tenham apresentado sintomatologia ao nascimento ou não, afetando muitos bebés com deficiências psicomotoras, cognitivas e visuais (74).

Entre 10 e 15% das crianças assintomáticas ao nascimento têm PANS. Para as infetadas congénitamente, a incidência aumenta para 60%. Esta manifestação clínica reflete danos na cóclea. A perda auditiva pode ser unilateral, bilateral, leve ou a perda total. Consoante o lactente é sintomático ou não, a idade varia para o seu aparecimento (33 meses e 44 meses respetivamente). Esta perda auditiva é progressiva durante a infância em metade das crianças. A PANS, de início tardio ou progressivo, afeta até 12% dos bebés com infeção congénita assintomática por CMV. A perda auditiva leva a que haja um comprometimento na linguagem, progredindo para um atraso na aprendizagem. Logo, o acompanhamento com os rastreios auditivos é assaz importante na deteção precoce da PANS, tendo em conta que a sua gravidade é diretamente proporcional ao atraso no diagnóstico, impedindo uma reabilitação em tempo útil (66,68,75).

Tem-se desenvolvido novas metodologias para o estudo da gravidade da doença, nomeadamente o uso de biomarcadores. Ao estudar os biomarcadores presentes no líquido amniótico, foram identificados alguns com significado clínico relevante, particularmente duas proteínas: recetor do ácido retinóico 2 (quemerina) e a proteína de ligação à galectina-3 (Gal-3BP). A quemerina é uma adipocina quimiotática multifuncional (funções reguladoras em processos metabólicos, imunológicos e inflamatórios). Os níveis séricos aumentados na grávida estão associados a diabetes mellitus gestacional e pré-eclampsia. A Gal-3BP é uma glicoproteína multifuncional imunomoduladora implicada na resposta do hospedeiro a infeções virais, incluindo, para além do CMV, o vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, na progressão do cancro e na subsequente transformação neoplásica das células (76).

Foi demonstrado que estas duas proteínas se encontram mais elevadas em fetos infetados congenitamente com sintomas em comparação com infetados assintomáticos (76).

As crianças com PANS apresentavam níveis significativamente mais baixos de quemerina e GAL-3BP em comparação com as crianças com sintomatologia mais grave. Desta forma, os dados recolhidos demonstraram que as duas proteínas funcionam como biomarcadores altamente preditivos para a gravidade da doença (76).

Concluindo, a análise conjunta das proteínas no líquido amniótico durante a gestação dos fetos infetados pode ser usada num contexto clínico, para melhorar a avaliação prognóstica dos fetos infetados congenitamente e para identificar um período para as intervenções terapêuticas (76).

8. Diagnóstico

Segundo a Sociedade Portuguesa de Virologia, o objetivo do diagnóstico passa por identificar as grávidas que podem estar suscetíveis à infeção primária pelo CMV. O rastreio e o diagnóstico da infeção durante a gravidez devem ser divididos entre pré-natal e pós-natal (61,63).

Idealmente, a primeira abordagem assenta na serologia, de modo a detetar imunoglobulinas M (IgM) e imunoglobulinas G (IgG) específicas do CMV, pré-concepcional, seguindo-se de uma segunda colheita, entre as 17 e 18 semanas de gestação. Por fim, uma terceira colheita no final da gravidez (Figura 5). Para ser uma infeção congénita necessitará de uma seroconversão das IgG durante a gravidez (63).

As IgM são as primeiras a aparecer durante uma infeção primária (atingindo o pico entre o primeiro e o terceiro mês), sendo utilizadas como um indicador agudo da infeção, após uma proliferação de linfócitos B, seguindo-se as IgG (77,78).

Caso não sejam detetadas IgG, significa que, até aquele momento, a gestante não teve qualquer contacto com vírus ou ainda não houve tempo suficiente para estes anticorpos proliferarem. O que se recomenda é um cuidado extra de modo a evitar uma futura infeção e voltar a repetir o teste serológico mais tarde (63,79).

Se ao fim do segundo momento de deteção dos anticorpos continuar a não ser reativo, apenas se deve manter os cuidados. Todavia, se for detetada uma seroconversão para as IgG específicas do CMV é feita uma amniocentese a partir da 21^a semana, sendo o CMV detetado através de cultura celular, ou por *polymerase chain reaction* (PCR). Consoante o resultado, tem de haver uma decisão obstétrica e materna sobre o mesmo.

Caso o resultado seja negativo, confirma-se a ausência ou presença de infeção congénita após o nascimento do feto. Contudo, se o resultado é positivo há um maior acompanhamento, designadamente a realização de ecografia a cada 2 a 4 semanas (78,79).

Se, porventura, apenas for detetado IgG, a grávida encontra-se imunizada (77–79).

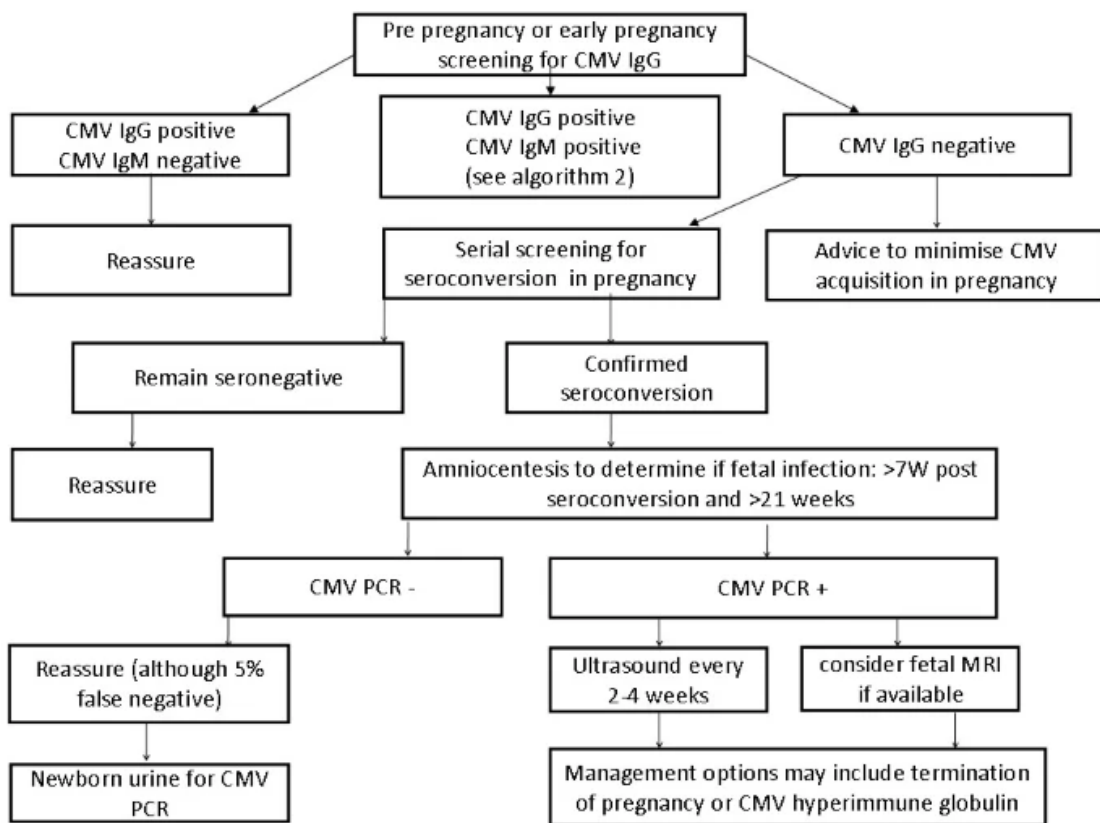


Figura 5: Algoritmo proposto para o screening do CMV (80).

Por último, se tanto as IgM, como as IgG forem reativas, é necessário continuar o screening. Os teste de titulação dos anticorpos IgM não têm uma elevada especificidade para a infeção primária, tendo em conta que podem persistir elevados durante meses até 2 anos, para além disso são capazes de estarem também positivas na reativação ou até mesmo nas reinfeções, o que resulta em falsos positivos para uma infeção primária. Como tal, é necessário proceder à avidéz das IgG. Esta corresponde à força da ligação entre as IgG e o antigénio. Quanto maior for o tempo que decorreu desde a infeção inicial, maior será a avidéz. Isto é, quanto maior for a avidéz mais antiga é a infeção (79,81–83).

Como se pode ver no algoritmo representado na Figura 6, caso a avidéz seja alta, a infeção é antiga (superior a 3 meses) e a grávida pode ficar mais descansada em relação à TMF. Se a avidéz for baixa ou inconclusiva, sugere-se a realização da amniocentese à 21^a semana. Novamente, consoante o resultado, há uma série de decisões a tomar entre os clínicos e a futura mãe sobre o mesmo.

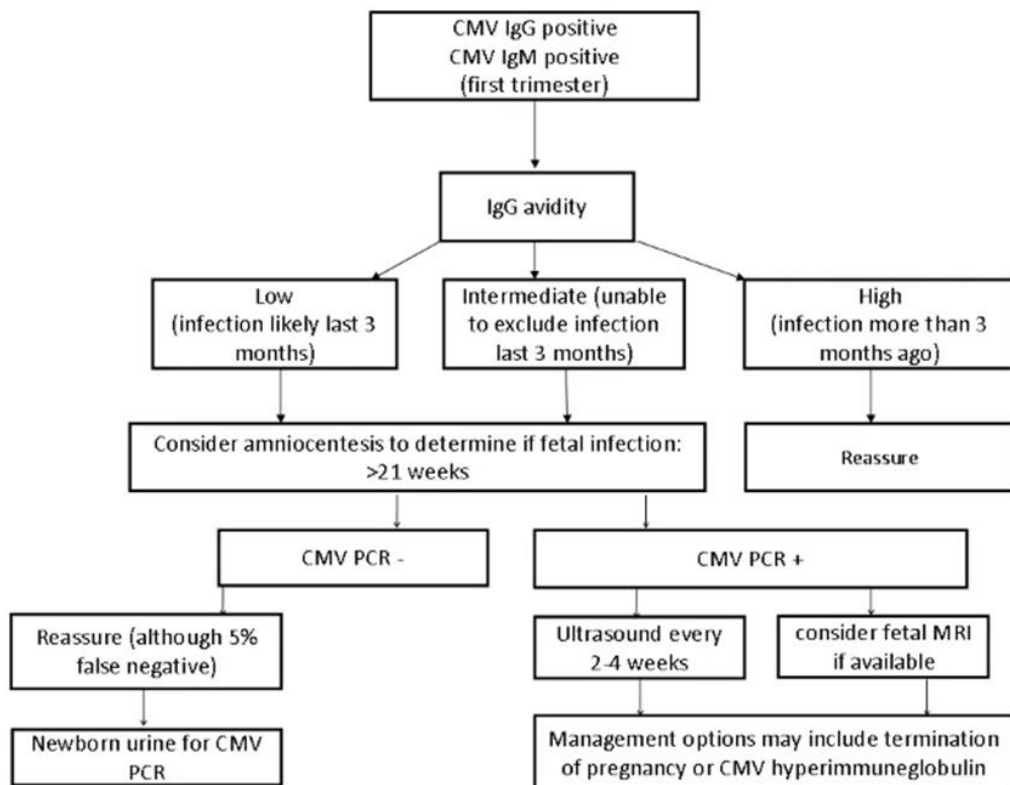


Figura 6: Algoritmo proposto para as mulheres grávidas infetadas pelo CMV (80).

O método de referência para o teste de diagnóstico pós-natal, quando há suspeitas de positividade para a infeção viral de CMV, envolve o isolamento viral, e/ou a deteção do genoma viral por PCR a partir de uma amostra de urina do bebé das primeiras 3 semanas de vida. Um resultado positivo pode ter sido consequência da transmissão através da placenta (63,81).

XXI Mestrado em Análises Clínicas
 Infecção por Citomegalovírus: patogénese e diagnóstico da infecção congénita

Quando se quer confirmar uma infeção, para além das 3 semanas (estudo retrospectivo), caso o resultado da urina for positivo ou caso hajam manifestações clínicas que sugiram uma infeção congénita, é realizado um PCR usando a amostra de sangue proveniente dos Guthrie Cards (Figura 7). A positividade deste teste, em combinação com resultado positivo da urina indicam que a infeção foi transmitida congenitamente (Figura 8). Se for recolhida uma urina após as primeiras 3 semanas de vida e o resultado da deteção viral for positivo, este é indicativo que a infeção foi transmitida por exposição a secreções vaginais durante o parto ou durante a amamentação (81).

The form is titled "PROGRAMA NACIONAL DO RASTREIO NEONATAL". It includes the following fields and sections:

- Top section: "Se esta colheita for uma repetição, assinala com uma cruz" (checkbox).
- Personal information: "Nome da Mãe", "Endereço", "C. Postal", "Localidade".
- Birth information: "Nascimento", "Idade Gestacional", "Seg. Soc.", "ADSE", "Colheita", "Peso", "Sexo", "Gémeos", "Nº Beneficiário", "Nº Utente".
- Medical history: "Alimentação - Peito", "Outra", "Ictericidade", "Medicação", "Qual", "Local de Colheita", "Distrito".
- Bottom section: "COLABORE CONNOSCO no pezinho do bebé pode estar o seu futuro" and "ENVIAR PARA: INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DOUTOR RICARDO JORGE, Unidade de Rastreo Neonatal, Metabolismo e Genética, Rua Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, Telef. 223 401 168 / 18 / 70".
- Barcode: "5201900039086".
- Vertical text on the left: "9033M", "LOT1 7153018W171", "2022-08-31", "DGH URN-JM21_03".
- Vertical text on the right: "Para os Pais: Este cartão contém o resultado do teste do seu filho em relação a infeção da tripla e o teste de rastreio da fenilalanina. Confirme a recepção da ficha e o resultado do teste do seu filho em relação a infeção da tripla e o teste de rastreio da fenilalanina, com este número de código de barras e o seu número de contacto.".

Figura 7: Exemplo de um Guthrie Card português para o programa nacional do rastreio neonatal (teste do pezinho) (84).

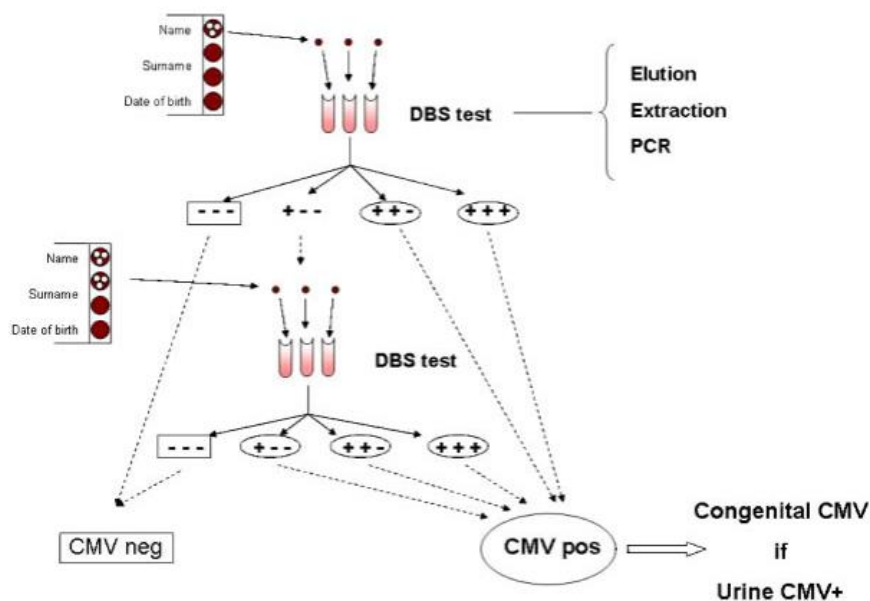


Figura 8: Diagrama utilizado com base nos Guthrie Cards (81).

9. Tratamento/Profilaxia e Vacinação

Atualmente, não há nenhuma forma de garantir se fazer a prevenção farmacológica da infecção pelo CMV, assim como da sua transmissão vertical. No entanto, são dadas alternativas para protocolos de investigação. Os que apresentam resultados mais promissores incidem na administração de globulinas hiperimune anti-CMV e o fármaco valaciclovir. Estas duas medidas farmacológicas estão a ser estudadas, tanto para a prevenção, como para o tratamento da infecção congênita (85–87).

De modo a prevenir a transmissão vertical é administrado, durante a gravidez, as globulinas hiperimune específicas do CMV. Embora haja estudos que indiquem a sua mais-valia, tanto na diminuição da TMF, como na gravidade da doença, nem sempre o é comprovado. Isto é, em determinados estudos não há uma redução de risco estatisticamente significativa da transmissão materna durante a gravidez, em comparação com o grupo de placebo (85–87).

Para além das globulinas hiperimune, também o fármaco valaciclovir é usado para prevenir a TMF e tratar os fetos com sintomas leves a moderados. Este é administrado oralmente nas grávidas que contraíram a infecção no período periconcepcional ou durante o primeiro trimestre da gravidez, pois é a idade gestacional que apresenta uma maior eficácia no tratamento da redução da transmissão vertical. O fármaco é um ester de L-valina do aciclovir que apresenta, embora baixa, atividade contra a DNA polimerase do CMV. Para haver algum efeito é necessário administrar doses elevadas, nomeadamente, 8 gramas por dia, distribuídas entre duas a quatro vezes ao dia. O tratamento começa por volta das 22 semanas de gravidez, havendo uma clara diminuição da carga viral no sangue do feto, aumentando a proporção de neonatos assintomáticos, em cerca de 40%. O valaciclovir não diminui a carga viral transmitida pelo leite materno, mas reduz moderadamente a carga viral das excreções cervicais (86–89).

As transaminases e a creatinina são doseadas no soro materno antes e durante o tratamento, de 15 em 15 dias, de modo a interromper o uso do fármaco no caso de disfunção hepática ou renal. Mesmo sem historial clínico, é possível apresentar insuficiência tanto hepática, como renal que normalmente cessam com a interrupção do tratamento (88,89).

Existem, cada vez mais, estudos que comprovam o benefício do uso de doses elevadas de valaciclovir nas gestantes com infecção primária no primeiro trimestre, de modo a prevenir a transmissão vertical. No entanto, ainda é eticamente incorreto usar o fármaco valaciclovir a nível clínico, pois a literatura publicada é limitada pelo pequeno número de casos e subgrupos heterogêneos em termos de idade gestacional na infecção materna, grau de viremia materna, idade gestacional no início da terapia, duração da terapia e desfechos de segurança materna (87,89).

Para além dos bons resultados sobre a eficácia do valaciclovir em relação às imunoglobulinas, este tem um custo inferior e é mais eficiente na redução da viremia, sendo utilizado tanto na prevenção da transmissão vertical, assim como no tratamento da infeção congénita (87).

A longo prazo deve-se avaliar o impacto do tratamento e a sua capacidade de diminuir, com segurança e eficácia, a morbilidade neonatal relacionada com a infeção congénita a curto e longo prazo (88).

Em suma, mostra-se eficaz o uso de terapia antiviral pré-natal com valaciclovir após seroconversão materna para CMV, especialmente quando a infeção é adquirida no primeiro trimestre da gravidez. Por outro lado, não há evidências disponíveis de que a terapia pré-natal com valaciclovir melhore o resultado perinatal após a ocorrência de infeção fetal (85–89).

Há muito que se considera importante o desenvolvimento de uma vacina contra a infeção pelo CMV, tendo em conta o seu peso na saúde pública (90).

Estão a ser estudados marcadores imunológicos, nomeadamente antígenos capazes de provocar uma resposta humoral (a glicoproteína de superfície gB; o trímero gH/gL/gO; e a proteína do tegumento pp65), que podem atuar como agentes contra a infeção, tal como o seu papel na duração e eficácia na proteção (90,91).

É importante distinguir os períodos em que a vacina contra o CMV seria útil: durante a infância, a adolescência e/ou em adultos. A vacinação durante a infância reduziria a infeção congénita, uma vez que as crianças infetadas são as principais fontes de transmissão viral às mulheres grávidas. A sua administração na adolescência e/ou em adultos também iria reduzir a doença, pois as futuras grávidas já estariam imunizadas (90).

Dada a complexidade desde o número de participantes, aos anos necessários para os acompanhar, incluindo os bebés, de modo a perceber se há sequelas provocadas pela doença é algo que dificulta as agências reguladoras a aceitarem o investimento necessário (90).

A prevenção para a infeção pelo CMV é ainda um problema a resolver para a aprovação da vacina (90,91).

10. Conclusão

A infeção congénita por CMV apresenta uma elevada prevalência mundial, sendo a infeção viral mais comum. Esta é muitas vezes subdiagnosticada, pois apenas 10% dos infetados apresentam sintomatologia ao nascimento.

No entanto, a prevenção continua a ser uma das medidas mais eficazes contra a infeção congénita, nomeadamente, alterações comportamentais que antecedem a gravidez e durante a mesma, visto que medidas farmacológicas ainda são escassas.

É importante detetar precocemente a infeção congénita, com vista a um melhor seguimento médico à patologia do neonatal. Tem-se desenvolvido metodologias de diagnóstico para que os resultados sejam os mais fidedignos, com o objetivo de melhorar as decisões entre os obstetras e as mães.

Deste modo, há um acompanhamento mais adequado, evitando-se o desenvolvimento de sequelas por terapias erradas, gerindo-se, da melhor forma, as expetativas dos pais em relação à doença do filho. Aconselha-se o seguimento, a longo prazo, das crianças infetadas por uma equipa multidisciplinar. Esta deve incluir especialistas em doenças infecciosas pediátricas, otorrinologia pediátrica, desenvolvimento comportamental infantil e neurologia.

11. Referências Bibliográficas Gerais

1. Apresentação. Joaquim Chaves Saúde [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponível em: https://www.jcs.pt/pt/conheca_a_joaquim_chaves_saude/ver/2
2. Faísca M. DESAFIOS DA ACREDITAÇÃO DO LABORATÓRIO CLÍNICO. 2017.
3. Exame do PSA - O que é e como se faz | Instituto da Próstata [Internet]. [citado 18 de fevereiro de 2023]. Disponível em: <https://www.institutodaprostata.com/pt/analises-e-exames/exame-do-psa>
4. Martins dos Santos J, Cavacas A, José S. Silva A, Zagalo C, Grillo Evangelista J, Oliveira P, et al. Anatomia Geral Moreno. 6ª. Egas Moniz Publicações; 2011.
5. Srikanth KK, Lotfollahzadeh S. Phlebotomy. Chest [Internet]. 3 de dezembro de 2022 [citado 18 de fevereiro de 2023];143(6):1831. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574569/>
6. A. Victor Hoffbrand, Paul A.H. Moss. Hoffbrand's Essential Haematology. 7Th. 2016.
7. M. Pádua M. Patologia Clínica para Técnicos - Tomo II Química Clínica. Lusociência-Edições Técnicas e Científicas, Lda.; 2009. 520.
8. Final Report on the Safety Assessment of EDTA, Calcium Disodium EDTA, Diammonium EDTA, Dipotassium EDTA, Disodium EDTA, TEA-EDTA, Tetrasodium EDTA, Tripotassium EDTA, Trisodium EDTA, HEDTA, and Trisodium HEDTA 1. 2002;
9. Zendjabil M. Glycated albumin. Vol. 502, Clinica Chimica Acta. Elsevier B.V.; 2020. p. 240–4.
10. Getz TM, Turgeon A, Wagner SJ. Sodium citrate contributes to the platelet storage lesion. Transfusion (Paris). 1 de junho de 2019;59(6):2103–12.
11. Serum separator tubes, SST™ II advance, BD Vacutainer® | VWR [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponível em: <https://pt.vwr.com/store/product/7597859/serum-separator-tubes-ssttm-ii-advance-bd-vacutainer>
12. Utilmédica Lda: Tubo BD Vacutainer CPT (Heparina Sódio, Ficoll) 8ml, 16x152mm, vidro, tampa convencional cx 60 [Internet]. [citado 6 de março de 2023]. Disponível em: <https://utilmedica.pt/tubo-bd-vacutainer-cpt-heparina-sodio-ficoll-8ml-16x152mm-vidro-tampa-convencional-cx-60.html>
13. BD Vacutainer® PPT™ Plasma Preparation Tube [Internet]. [citado 15 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.bdbiosciences.com/en-de/products/blood-collection/blood-collection-tubes/bd-vacutainer-ppt-plasma-preparation-tube.362795>
14. XN-Tecnologia-Português. [Internet]. [citado 13 de março de 2023] Disponível em: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-TecnologiaPortugu%C3%AAs.pdf>

15. Novo Design Novas Possibilidades Analisadores Hematológicos Automatizados SérieXN. [Internet]. [citado 13 de março de 2023] Disponível em: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Portugu%C3%AAs.pdf>
16. XN-Series Clinical Case Report Vol.2. [Internet]. [citado 13 de março de 2023] Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/540748939/XN-Series-ClinicalCaseReport-Vol->
17. Prescrição e determinação do hemograma Médicos do Sistema Nacional de Saúde e Laboratórios Clínicos. 2011.
18. Ford J, Ford J. Red blood cell morphology. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 1 de junho de 2013 [citado 13 de março de 2023];35(3):351–7. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijlh.12082>
19. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier MF, Courtade-Saïdi M, Vincent S, et al. Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa: revue de la littérature et apport de l'assurance qualité. *Ann Pathol*. 1 de agosto de 2015;35(4):294–305.
20. INTERRLINER USER MANUAL [Internet]. Disponível em: <http://www.rrmechatronics.com>
21. Sander U 1941, Vereinigung der Verfolgten des Naziregimes - Bund der Antifaschistinnen und Antifaschisten. Weissbuch in Sachen Demokratie.
22. Madhusudhan T, Kerlin BA, Isermann B. The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. Vol. 12, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 94–109.
23. Technical Manual, 17th Edition (2011) American Association of Blood Banks (AABB).
24. TRANSFUSÃO DE COMPONENTES SANGUÍNEOS E DERIVADOS POCKETBOOK PROF. DOUTOR FERNANDO FONSECA EFE.
25. cobas ® 6500 urine analyzer series Fully automated urine work area on a modular platform. [Internet]. [citado 14 de março de 2023]. Disponível em: <https://pdf.medicaexpo.com/pdf/roche/cobas-6500-urine-analyzer-series/71020-136210.html>
26. RIDACOM – Comprehensive Bioscience Supplier - NADAL hCG Pregnancy, rapid test for detection of hCG in urine or serum, test strips<pt> [Internet]. [citado 14 de março de 2023]. Disponível em: <https://www.ridacom.com/en/products/view/7098>
27. cobas ® 8000 modular analyzer series. [Internet]. [citado 14 de março de 2023]. Disponível em: <https://manualzz.com/doc/56042117/roche-cobas-8000---isemoduleoperators-manual>
28. Hipólito-Reis C, Nuno M. P. Alçada M, Azevedo I. *Práticas de Bioquímica para as Ciências da Saúde*. Lidel- Edições técnicas, Lda; 2002. 512.

29. Richter MM. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem Rev.* 2004 Jun;104(6):3003-36. doi: 10.1021/cr020373d. PMID: 15186186.
30. Richter MM, Ma; C, Cao Y, Gou X, Zhu JJ. *Electrochemiluminescence Sensing.* Vol. 36, *Anal. Chem.* 2004.
31. Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S. *Immunoassay Methods. Assay Guidance Manual* [Internet]. 8 de julho de 2019 [citado 15 de março de 2023]; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>
32. Anti-drug Antibody (ADA) Bridging ELISA - Creative Biolabs [Internet]. [citado 15 de março de 2023]. Disponível em: <https://www.antibody-creativebiolabs.com/anti-drug-antibody-ada-bridging-elisa.htm>
33. Sobczyn A, Harrington DJ. Laboratory assessment of folate (Vitamin B9) status. *J Clin Pathol.* 1 de novembro de 2018;71(11):949–56.
34. Elecsys Folate III Cobas. [Internet]. [citado 15 de março de 2023]. Disponível em: https://labogids.sintmaria.be/sites/default/files/files/folate_iii_restand._2019-11_v3.pdf
35. Lee MY, Kang SY, Lee WI, Kim MH. Need for Confirmatory Neutralization Tests for Hepatitis B Surface Antigen Tests in Populations with Intermediate Prevalence. *Lab Medicine.* 1 de setembro de 2021;52(5):485–92.
36. Elecsys HBsAg Confirmatpry Test Cobas. [Internet]. [citado 15 de março de 2023].
37. Solid Sample Analysis: Direct and Slurry Sampling using GF-AAS and ETV-ICP - Google Livros [Internet]. [citado 15 de março de 2023]. Disponível em: https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=urToCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&ots=FKRpx1cliO&sig=Q4qaEx7yiO2arvEj2uftpq1_-OY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
38. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry - EAG Laboratories [Internet]. [citado 15 de março de 2023]. Disponível em: <https://www.eag.com/techniques/gfaas/>
39. Ehsani S, James D, Oskouie ZM. Determining selenium speciation by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Environ Monit Assess.* 1 de setembro de 2021;193(9).
40. Stewart K. *Vitamins: Their Role in the Human Body* by GFM Ball. *Annals of Clinical Biochemistry.* 2006;43(1):92-92. doi:10.1258/00045630677514171
41. High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine* Vol. 75, No. Sup2
42. Michela D'alessandro M, Gennaro G, Tralongo P, Maringhini S. KIDNEY DISEASES Fourier Transform Infrared Analysis of Urinary Calculi and Metabolic Studies in a Group of Sicilian Children [Internet]. Vol. 11, Original Paper *Iranian Journal of Kidney Diseases* |. 2017. Disponível em: www.ijkd.org
43. *Front Matter.* Em: *Handbook of Spectroscopy.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005. p. i–xxxii.

44. GastroCH 4 ECK TM Gastrolyzer® Scientific contributions to health. User manual GastroCH 4 ECK TM Gastrolyzer® [Internet]. Disponível em: www.Manualslib.com
45. Instruction for Use Kibion® Dynamic Kibion® Dynamic Base Kibion® Dynamic Pro [Internet]. Disponível em: www.kibion.com
46. Tan X, Zhang H, Li J, Wan H, Guo Q, Zhu H, et al. Non-dispersive infrared multi-gas sensing via nanoantenna integrated narrowband detectors. *Nature Communications* 2020 11:1 [Internet]. 16 de outubro de 2020 [citado 16 de março de 2023];11(1):1–9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-19085-1>
47. Gamma Counter [Internet]. 2002. Disponível em: www.perkinelmer.com/lifesciences
48. Hicks JM. Fluorescence immunoassay. *Hum Pathol.* 1984 Feb;15(2):112-6. doi: 10.1016/s0046-8177(84)80049-0. PMID: 6365732.
49. Mehta K. Radiation: Basic principles. Vol. 42, *Journal of Vascular Surgery*. Mosby Inc.; 2005. p. 1237–8.
50. 7 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT [Internet]. Disponível em: <https://www.diasource-diagnostics.com/>
51. Gersen SL, Keagle MB. *Clinical Cytogenetics SECOND EDITION EDITED BY Clinical Cytogenetics SECOND EDITION EDITED BY Includes Updated ISCN Guidelines*.
52. R.J.M McKinlay Gardner, Grant R Sutherland, Lisa G. Shaffer. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 4.^a ed. Oxford University Press, 2011; 2011. 648.
53. MagNA Pure 24 System Enter a new world of productivity. Published by Roche Molecular Systems, Inc
54. Bartels CL, Marchetti AL, Edward Highsmith W, Tsongalis GJ. Real time PCR detection of the PI*Z and PI*S mutations associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Transl Res.* 2009 Aug 10;1(4):406-11. PMID: 19956452; PMCID: PMC2780033.
55. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986–94.
56. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Vol. 27, *Molecular Aspects of Medicine*. 2006. p. 95–125.
57. Life technologies. *Real-time PCR handbook*.
58. A infecção pelo vírus citomegalo - estudos em Portugal [Internet]. [citado 30 de novembro de 2021]. Disponível em: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/English/Publications/OtherPubs/Pages/InfeccaoVirusCitomegaloPortugalEN.aspx>
59. Brizić I, Hiršl L, Britt WJ, Krmpotić A, Jonjić S. Immune responses to congenital cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* [Internet]. 1 de outubro de 2018 [citado 8 de fevereiro de 2022];20(9–10):543. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6019571/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111111/)

60. Cannon MJ, Griffiths PD, Aston V, Rawlinson WD. Universal newborn screening for congenital CMV infection: What is the evidence of potential benefit? *Rev Med Virol*. 1 de setembro de 2014;24(5):291–307.
61. Protocolos de Diagnóstico e Terapêutica em Infecçologia Perinatal. [Internet]. [citado 8 de fevereiro de 2022]. Disponível em: http://www.spp.pt/UserFiles/File/Infecçologia_Perinatal_2007/Infecçologia_Perinatal.pdf
62. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr* [Internet]. 17 de abril de 2017 [citado 8 de fevereiro de 2022];43(1). Disponível em: </pmc/articles/PMC5393008/>
63. Barroso H, Meliço-Silvestre A, Tavira N. *Microbiologia Médica 2*. 1º. Lisboa: LIDEL-Estações Técnicas, LDA; 2014. 0–592 p.
64. Gowda VK, Kulhalli P, Vamyanmane DK. Neurological Manifestations of Congenital Cytomegalovirus Infection at a Tertiary Care Centre from Southern India. *J Neurosci Rural Pract* [Internet]. 1 de janeiro de 2021 [citado 21 de fevereiro de 2022];12(1):133. Disponível em: </pmc/articles/PMC7846325/>
65. Buxmann H, Hamprecht K, Meyer-Wittkopf M, Friese K. Primary human cytomegalovirus (HCMV) infection in pregnancy. *Dtsch Arztebl Int*. 27 de janeiro de 2017;114(4):45–52.
66. Ostrander B, Bale JF. Congenital and perinatal infections. Em: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 133–53.
67. Wang S, Wang T, Zhang W, Liu X, Wang X, Wang H, et al. Cohort study on maternal cytomegalovirus seroprevalence and prevalence and clinical manifestations of congenital infection in China. *Medicine* [Internet]. 1 de fevereiro de 2017 [citado 21 de fevereiro de 2022];96(5). Disponível em: </pmc/articles/PMC5293462/>
68. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: Advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. Vol. 43, *Italian Journal of Pediatrics*. BioMed Central Ltd.; 2017.
69. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome. 2013 [citado 22 de junho de 2023]; disponível em: https://academic.oup.com/cid/article/57/suppl_4/S178/494466
70. Zhou YP, Mei MJ, Wang XZ, Huang SN, Chen L, Zhang M, et al. A congenital CMV infection model for follow-up studies of neurodevelopmental disorders, neuroimaging abnormalities, and treatment. 2022; disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.152551>

71. Auriti C, De Rose DU, Santisi A, Martini L, Piersigilli F, Bersani I, et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1 de Outubro de 2021;1867(10).
72. Gowda VK, Kulhalli P, Vamyanmane DK, Gowda K. Association for Helping Neurosurgical Sick People. *Journal of Neurosciences in Rural* [Internet]. 2021 [citado 22 de junho de 2023];12(12):133–6. Disponível em: <https://doi.org/>
73. The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status.
74. Diogo MC, Glatter S, Binder J, Kiss H, Prayer D. The MRI spectrum of congenital cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn.* 1 de janeiro de 2020;40(1):110–24.
75. Lazzarotto T, Gabrielli L, Guerra B, Cervi F, Piccirilli G, Simonazzi G, et al. Diagnosis and prognosis of congenital CMV infection: A case report and review of the literature. *Em: Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Informa Healthcare;* 2014. p. 34–40.
76. Vorontsov O, Levitt L, Lilleri D, Vainer GW, Kaplan O, Schreiber L, et al. Amniotic fluid biomarkers predict the severity of congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Investigation.* 1 de Junho de 2022;132(11).
77. Nigro G. Hyperimmune globulin in pregnancy for the prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2 de novembro de 2017;15(11):977–86.
78. Munro SC, Hall B, Whybin LR, Leader L, Robertson P, Maine GT, et al. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* [Internet]. Setembro de 2005 [citado 22 de junho de 2023];43(9):4713–8. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.43.9.4713-4718.2005>
79. Walker SP, Palma-Dias R, Wood EM, Shekleton P, Giles ML. Cytomegalovirus in pregnancy: To screen or not to screen. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 18 de abril de 2013 [citado 21 de junho de 2023];13(1):1–8. Disponível em: <https://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2393-13-96>
80. Susan P Walker, Ricardo Palma-Dias, Erica M Wood, Paul Shekleton, Michelle L Giles. Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or notto screen.
81. Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. *Rev Med Virol.* Novembro de 2006;16(6):385–92.
82. Maher K Gandhi, Rajiv Khanna. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments.

83. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the Diagnosis of Cytomegalovirus Infection [Internet]. Vol. 11, Infectious Disorders-Drug Targets. 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cmvc/clinicians.htm>
84. Vilarinho L. Rastreio Neonatal em Portugal: Presente e futuro.
85. Hughes BL, Clifton RG, Rouse DJ, Saade GR, Dinsmoor MJ, Reddy UM, et al. A Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus Infection. *New England Journal of Medicine*. 29 de julho de 2021;385(5):436–44.
86. Ross SA, Kimberlin D. Clinical outcome and the role of antivirals in congenital cytomegalovirus infection. Vol. 191, *Antiviral Research*. Elsevier B.V.; 2021.
87. Zammarchi L, Lazzarotto T, Andreoni M, Campolmi I, Pasquini L, Di Tommaso M, et al. Management of cytomegalovirus infection in pregnancy: is it time for valacyclovir? Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2020. p. 1151–4.
88. Faure-Bardon V, Fourgeaud J, Stirnemann J, Leruez-Ville M, Ville Y. Secondary prevention of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir following maternal primary infection in early pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 1 de Outubro de 2021;58(4):576–81.
89. D'Antonio F, Marinceu D, Prasad S, Khalil A. Effectiveness and safety of prenatal valacyclovir for congenital cytomegalovirus infection: systematic review and meta-analysis. Vol. 61, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. John Wiley and Sons Ltd; 2023. p. 436–44.
90. Krause PR, Bialek SR, Boppana SB, Griffiths PD, Laughlin CA, Ljungman P, et al. Priorities for CMV vaccine development. Vol. 32, *Vaccine*. 2013. p. 4–10.
91. Plotkin SA. Preventing infection by human cytomegalovirus. *Journal of Infectious Diseases*. 2021;221:S123–7.

12. Anexos

Regras (Validação)	Parâmetros	Série	Condições	Ações	Observações
Interferência PLT → Verificar PLT no esfregaço	-	PLT	Alarme PLT_Abn_Scattergram ou diferença nos valores de PLT-I e PLT-O	Lâmina	Se não houver histórico de valores < 140 com índices de plaquetas reportados
PLT valor baixo em 'situação inicial' ou Delta Check positivo → Esfregaço	PLT	PLT	PLT < 140 x10 ⁹ /L	Lâmina	
Contagem de PLT aumentada	PLT	PLT	PLT > 600 x10 ⁹ /L	Validação	
Delta Check PLT positivo → Verificar amostra	PLT	PLT	Δcheck PLT, decrescente, s/interferências, PLT < 140 x10 ⁹ /L	Validação	
Agregados Plaquetários?	-	PLT	"PLT_Clumps?" e (PLT < 140 ou "PLT_Abn_Distribution" ou índices fora dos limites)	Lâmina	
PLT valor baixo → PLT-F	PLT	PLT	PLT < 100, s/ Clumps	Validação	
PLT baixas → Verificar coágulo!	PLT	PLT	PLT < 140, Δcheck não Negativo	Validação	
RBC fragments? → Esfregaço para verificar morfologia RBC	-	RBC	Alarme Fragments?, com pedido inicial CBC+DIFF e Hb ≤ 11,0	Lâmina	Aquecer e Repetir + Conf. Por Ret (HGB-O)
Esquistocitos	FRC%	RBC	FRC ≥ 1 %, HGB ≤ 11,0 g/dL	Lâmina	
HGB baixa em 'situação inicial ou follow-up' → Esfregaço	HGB	RBC	HGB ≤ 7,0 g/dL (9,0 p/ criança)	Lâmina	
Macrocitose em 'situação inicial ou follow-up' → Esfregaço	MCV	RBC	MCV ≥ 105 fL	Lâmina	
NRBC presentes → Esfregaço para verificar morfologia RBC	NRBC%	RBC	NRBC ≥ 0,5 /100WBC	Lâmina	
Hematócrito baixo	HCT	RBC	HCT < 18% (30 p/ criança)	Validação	
Hematócrito elevado	HCT	RBC	HCT > 61%	Validação	
Limite Crítico superior de HGB → Informar médico	HGB	RBC	HGB ≥ 18,5 g/dL	Validação	
Lipemia / hemólise / aglutininas/ hiposmolaridade? → Verificar amostra	MCHC	RBC	MCHC ≥ 36,1	Validação	
Anisocitose ou população dimórfica	RDW	RBC	RDW-CV > 20%	Validação	
Reticulocitose	RET#	RET	RET# > 200 x10 ⁹ /L	Validação	
Leucocitose	WBC	WBC	WBC ≤ 4,0 x10 ⁹ /L e Blasts/Abn_Lympho?	Lâmina	
Linfócitos anormais ou blasts?	-	WBC	Blasts/Abn_Lympho?, se alarme acima de 140	Lâmina	
Não é possível o DIFF no analisador! -> Esfregaço	-	WBC	WBC_Abn_Scattergram, sem resultados no DIFF	Lâmina	
Basofilia	BASO	WBC	BASO ≥ 0,3 x10 ⁹ /L	Lâmina	
Eosinofilia	EO#	WBC	EO ≥ 2,0 x10 ⁹ /L ou EO ≥ 1,5 x10 ⁹ /L se repetido em 180dias e WBC ≥ 12,0	Lâmina	
Granulócitos Imaturos	IG	WBC	IG ≥ 4,0%	Lâmina	
Linfocitose em função da idade	LYMPH#	WBC	LYMPH ≥ 5,0 x10 ⁹ /L (≥ 7,0 p/ criança)	Lâmina	
Linfócitos atípicos (reativos)	HFLC	WBC	HFLC% > 1%	Validação	
Monocitose	MONO#	WBC	MONO# ≥ 1,2 x10 ⁹ /L	Validação	
Monocitose	MONO#	WBC	MONO# ≥ 2,0 x10 ⁹ /L	Lâmina	
Leucocitopenia	WBC	WBC	WBC ≤ 4,0 x10 ⁹ /L	Validação	
Leucocitose	WBC	WBC	WBC ≥ 30 x10 ⁹ /L	Validação	