

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**USO DE DRIED BLOOD SPOTS (DBS) COMO AMOSTRA NO  
DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DE INFEÇÕES VIRAIS**

Mariana Isabel Rebola Teles

Relatório de Estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo  
Pereira

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**2021**

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**USO DE DRIED BLOOD SPOTS (DBS) COMO AMOSTRA NO  
DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DE INFEÇÕES VIRAIS**

Mariana Isabel Rebola Teles

Relatório de Estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo  
Pereira

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**2021**

## **Agradecimentos**

É com muita alegria que termino este relatório de estágio. Este trabalho é o resultado de uma etapa onde aprendi muito e cresci enquanto pessoa e profissional. Foram três anos de aprendizagem, de esforço e dedicação para que chegasse o momento de concretizar este grande sonho.

Antes de mais, quero agradecer ao pessoal docente e não docente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa por todos os ensinamentos e por todo o apoio prestado neste percurso.

Um especial agradecimento ao meu orientador, Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira, pela simpatia, conhecimento partilhado e, sobretudo, pela compreensão. É um grande professor.

À Doutora Lurdes Monteiro pela receção no laboratório da SYNLAB e pela disponibilidade demonstrada em me auxiliar durante o estágio profissionalizante.

À minha orientadora de estágio, Doutora Anabela Sousa, pela generosidade e acessibilidade.

Aos técnicos e auxiliares que trabalham na SYNLAB pela prontidão em ajudar-me, pela paciência e amizade, mas, sobretudo por servirem de exemplo do que é ser um bom profissional.

Um agradecimento enorme à minha colega e amiga Inês Gabriel, pelo companheirismo e força que me deu para terminar esta etapa. Foi, sem dúvida, um grande apoio.

Às minhas amigas, Ana Nunes e Dora Boieiro, por todo o carinho, preocupação e amizade.

Resta-me agradecer aos grandes pilares da minha vida, os meus pais. Obrigada por embarcarem comigo em todos os desafios e por estarem sempre presentes. Sem vocês nada disto seria possível.

Por fim, quero deixar um eterno obrigado ao maior apoio que tive nesta aventura, ao meu namorado Duarte Soares, por nunca desistir de mim e por me apoiar incondicionalmente em todos os momentos.

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
**LABORATÓRIO CENTRAL SYNLAB – LISBOA**

Mariana Isabel Rebola Teles

**ORIENTAÇÃO**

Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**2021**

## Resumo

O presente trabalho define-se como elemento final do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, sendo composto por duas partes distintas: o relatório de estágio e a monografia.

O estágio decorreu no laboratório central da SYNLAB, em Lisboa, tendo tido a duração de setecentas e quarenta e cinco horas. Durante este período, tive a oportunidade de estagiar nas valências da Fase Pré-Analítica, Hematologia, Imunologia e Bioquímica. O relatório de estágio tem por objetivo descrever as atividades realizadas em cada uma das valências, de modo a compreender todo o processo analítico.

**Palavras-chave:** Estágio, Análises, Hematologia, Imunologia, Bioquímica

## Abstract

The present work is defined as the final element of the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon, being composed of two distinct parts: the internship report and the monography.

The internship took place in SYNLAB's central laboratory, in Lisbon, and lasted seven hundred and forty-five hours. During this period, I had the opportunity to do an internship in the Pre-Analytical phase, Hematology, Immunology and Biochemistry. The internship report aims to describe the activities carried out in each of the valences, in order to understand the entire analytical process.

**Key-words:** Internship, Analysis, Hematology, Immunology, Biochemistry

# Índice

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Fase Pré-Analítica</b> .....	<b>2</b>
Colheita de Amostras .....	2
Venipunctura .....	3
Procedimento de Colheita de Amostras de Sangue .....	4
Transporte de Amostras .....	5
Receção de Produtos Biológicos .....	6
Triagem de Produtos Biológicos .....	7
Centrifugação de Amostras .....	7
Critérios de rejeição e aceitação de amostras .....	8
<b>Valência de Hematologia</b> .....	<b>8</b>
Contagem Automática de Células Sanguíneas .....	8
Hemograma.....	10
Esfregaço de Sangue Periférico.....	13
Observação da Série Vermelha .....	13
Observação das Populações Leucocitárias .....	16
Influência do Anticoagulante no Esfregaço de Sangue .....	17
Velocidade de Sedimentação.....	18
Método Modificado de Westergren .....	18
Método Automatizado Alifax <sup>TM</sup> (Test-1 <sup>TM</sup> ) .....	19
Hemoglobina Glicada .....	20
Hb 9210 <sup>TM</sup> Premier .....	20
Adams HA 8160 HbA1C.....	21
Doseamento da Hemoglobina S .....	22
Teste de Falciformação .....	22
Caso Clínico A .....	23
Caso Clínico B .....	24
Caso Clínico C.....	25
Hemostase e Coagulação .....	26
BCS <sup>®</sup> XP Siemens.....	27
Testes Baseados na Formação de Coágulo .....	28
Taxa de Protrombina (PT) .....	28
Tempo Parcial de Tromboplastina Ativado (APTT) .....	30
Fibrinogénio .....	30
Tempo de Trombina (TT).....	31
Testes Baseados na Análise da Fibrinólise .....	31
D-dímeros .....	31
Sistema proteína C-proteína S .....	32
Proteína C Funcional .....	32
Proteína S Livre Antigénica .....	33
Avaliação dos Fatores da Coagulação.....	33

Fator V .....	33
Fator VII .....	34
Fator VIII .....	34
Inibidores da Coagulação .....	35
Antitrombina .....	35
Anticoagulante Lúpico .....	35
Caso Clínico .....	36
Imunohematologia .....	37
Tipagem ABO RH .....	37
Teste de Coombs .....	37
Swing Twinsampler e Saxo ID-Reader .....	38
Citometria de Fluxo .....	40
Citômetro de Fluxo Navios™ Ex .....	40
Amostras Utilizadas em Citometria de Fluxo .....	41
Processamento de Amostras .....	41
Avaliação Externa da Qualidade em Hematologia .....	42
<b>Valência de Imunologia .....</b>	<b>43</b>
Autoimunidade .....	44
Imunofluorescência Indireta .....	44
Detecção de Autoanticorpos Antinucleares .....	45
Detecção de Autoanticorpos Anti Citoplasma dos Neutrófilos .....	46
Detecção de Doenças Hepáticas Autoimunes .....	47
Hepatite Autoimune .....	47
Colangite Biliar Primária .....	48
Perfis de Anticorpos .....	49
Imunoblot .....	49
Imunoquímica .....	50
Eletroforese de Proteínas .....	50
Imunofixação .....	52
Imunofixação na Urina .....	53
Serologia Manual .....	54
Aglutinação Direta .....	54
Reação de Wright .....	54
Teste de Widal .....	55
VDRL e RPR .....	56
Hemaglutinação .....	57
TPHA .....	57
Teste de Waaler Rose .....	58
Imunoensaios Cromatográficos .....	59
Teste rápido para o diagnóstico de Mononucleose Infeciosa .....	59
Teste rápido Anti-HIV-1/2 .....	60
<b>Valência de Bioquímica .....</b>	<b>61</b>
Atellica® Solution .....	62
Parâmetros Bioquímicos .....	62
Avaliação da Função Renal .....	62

Função Glomerular .....	63
Creatinina.....	63
Ureia .....	64
Ácido Úrico.....	64
Permeabilidade Glomerular .....	65
Proteinúria.....	65
Albuminúria .....	66
Função Reguladora .....	66
Sódio.....	67
Potássio .....	67
Cloro .....	68
Determinação dos Iões Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> .....	68
Avaliação da Função Hepática.....	69
Síntese Hepática .....	69
Proteínas Totais.....	69
Albumina .....	70
Função Excretora .....	71
Bilirrubina Total e Conjugada .....	71
Enzimas .....	72
Avaliação do Risco Cardiovascular .....	74
Lípidos e Lipoproteínas .....	74
Colesterol Total.....	75
Triglicéridos.....	75
Colesterol HDL .....	76
Colesterol LDL .....	77
Apolipoproteínas .....	78
Marcadores Cardíacos .....	79
Avaliação do Doente Diabético .....	81
Glucose.....	81
Insulina .....	82
Frutosamina.....	82
Avaliação do Metabolismo do Ferro.....	83
Ferro Sérico .....	84
Ferritina.....	84
Transferrina e Capacidade Total de Fixação do Ferro .....	85
Avaliação da Função Pancreática .....	85
Amilase .....	86
Lipase .....	87
Avaliação da Função Tiroideia .....	88
Tiroxina Total (T4) e Tiroxina Livre (FT4).....	88
Triiodotironina Total (T3) e Triiodotironina Livre (FT3) .....	89
Hormona Estimulante da Tiroide (TSH) .....	89
Anticorpos Anti-Tiroglobulina (Anti-Tg) .....	90
Anticorpos Anti-Peroxidase Tiroideia (Anti-TPO) .....	90
Avaliação do Metabolismo Fosfocálcico .....	91
Cálcio.....	91
Fósforo Inorgânico.....	92
Magnésio .....	93
Hormona da Paratiroide (PTH).....	94
Calcitonina .....	95
<b>Anexo 1. Perfil Imunofenotípico de Patologias Linfoproliferativas dos Linfócitos B.....</b>	<b>96</b>

<b>Anexo 2.</b> Valores de Referência em Hematologia .....	<b>97</b>
<b>Anexo 3.</b> Padrões Nucleares de Fluorescência na determinação de Anticorpos Antinucleares (ANA).....	<b>98</b>
<b>Anexo 4.</b> Valores de Referência da Eletroforese de Proteínas.....	<b>99</b>
<b>Anexo 5.</b> Princípios Analíticos utilizados na valência de Bioquímica.....	<b>100</b>
<b>Anexo 6.</b> Princípios analíticos dos parâmetros bioquímicos da Tireoide.....	<b>101</b>
<b>Anexo 7.</b> Valores de Referência em Bioquímica .....	<b>102</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>104</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> UniCel <sup>®</sup> DxH 800 series. . . . .	10
<b>Figura 2.</b> Microcitose num doente com traço de $\beta$ Talassemia. . . . .	14
<b>Figura 3.</b> Esfregaço de sangue periférico. . . . .	15
<b>Figura 4.</b> Esfregaço de sangue periférico. . . . .	15
<b>Figura 5.</b> Esfregaço de sangue periférico de doente com Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mieloide Aguda. . . . .	16
<b>Figura 6.</b> Esfregaço de sangue periférico. . . . .	17
<b>Figura 7.</b> Alifax <sup>™</sup> (Test-1 <sup>™</sup> ). . . . .	19
<b>Figura 8.</b> Hb 9210 <sup>™</sup> Premier. . . . .	211
<b>Figura 9.</b> Adams HA 8160 HbA <sub>1c</sub> . . . . .	222
<b>Figura 10.1.</b> Resultado de HPLC obtido no equipamento Adams HÁ 8160 HbA <sub>1c</sub> . . . . .	23
<b>Figura 10.2.</b> Resultado do Teste de Falciformação Positivo. . . . .	233
<b>Figura 11.</b> Resultado de HPLC obtido pelo equipamento Adams HÁ 8160 HbA <sub>1c</sub> . . . . .	244
<b>Figura 12.</b> Resultado de HPLC obtido através do equipamento Adams HÁ 8160 HbA <sub>1c</sub> . . . . .	255
<b>Figura 13.</b> Parâmetros da hemostase e coagulação analisados na secção de Hematologia.. . . .	266
<b>Figura 14.</b> Sistema BCS XP utilizado na testagem da hemostase. . . . .	277
<b>Figura 15.</b> Swing Twinsampler BIO-RAD <sup>®</sup> . . . . .	38
<b>Figura 16.</b> Saxo ID-Reader BIO-RAD <sup>®</sup> . . . . .	38
<b>Figura 17.</b> Cartões de confirmação ABD da BIO-RAD <sup>®</sup> . . . . .	39
<b>Figura 18.</b> Cartões utilizados na realização de testes de Coombs da BIO-RAD <sup>®</sup> . . . . .	39
<b>Figura 19.</b> Observação microscópica de amostra de líquido bronquioalveolar. . . . .	42
<b>Figura 20.</b> Observação microscópica de amostra de líquido pleural . . . . .	42
<b>Figura 21.</b> Avaliação morfológica de amostra de sangue periférico do programa de avaliação externa da qualidade. . . . .	43
<b>Figura 22.</b> Avaliação morfológica de amostra de sangue periférico do programa de avaliação externa da qualidade. . . . .	43
<b>Figura 23.</b> Equipamento automático Sprinter XL <sup>®</sup> utilizado na deteção de anticorpos antinucleares. . . . .	45

<b>Figura 24.</b> Padrões nucleares de fluorescência detetados em células HEP-2 na determinação de Anticorpos Antinucleares (ANA) por imunofluorescência indireta (IFI). .....	46
<b>Figura 25.</b> Padrões de fluorescência obtidos na detecção de Anticorpos Anti Citoplasma de Neutrófilos (ANCA) em vários substratos por imunofluorescência indireta (IFI). .....	47
<b>Figura 26.</b> Padrões de fluorescência obtidos na detecção de Anticorpos Anti-Musculatura Lisa (ASMA) e Anticorpos Anti Microssomas Fígado-Rim (LKM-1) em vários substratos por imunofluorescência indireta (IFI). .....	48
<b>Figura 27.</b> Padrão de fluorescência obtido na detecção de Autoanticorpos Anti-Mitocôndria (AMA) em substrato de rim de rato por imunofluorescência indireta (IFI). . .....	49
<b>Figura 28.</b> Tira-teste para determinação qualitativa de autoanticorpos humanos da classe IgG para dezasseis antígenos diferentes. . .....	49
<b>Figura 29.</b> Exemplo de gel de agarose obtido através da realização de Eletroforese de Proteínas em amostra de soro no equipamento Hydrasys 2 da Sebia®. .....	51
<b>Figura 30.</b> Perfis Eletroforéticos de Proteínas. ....	51
<b>Figura 31.</b> Imunofixação em amostra de soro para classificação de proteína monoclonal através do equipamento Hydrasys 2 da Sebia®. ....	52
<b>Figura 32.</b> Imunofixação em amostra de urina para pesquisa de Proteína de Bence Jones através do equipamento Hydrasys 2 da Sebia®. ....	53
<b>Figura 33.</b> Resultado do teste de RPR ( <i>Rapid Plasma Reagin</i> ) para diagnóstico de anticorpos anti- <i>treponema pallidum</i> . ....	57
<b>Figura 34.</b> Teste de TPHA ( <i>T. pallidum-particle agglutination</i> ) para detecção de anticorpos anti- <i>treponema pallidum</i> . . .....	58
<b>Figura 35.</b> Teste rápido para diagnóstico da Mononucleose Infeciosa (MI). ....	60
<b>Figura 36.</b> Teste rápido de diagnóstico de infeção por vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) do tipo 1 e 2.....	61
<b>Figura 37.</b> Representação da cadeia formada pelos vários equipamentos que compõem o Atellica® Solution.....	62
<b>Figura 38.</b> Enzimas e proteínas cardíacas no soro após um enfarte agudo do miocárdio.. .....	79
<b>Figura 39.</b> Alterações dependentes do tempo na amilase e lipase séricas após pancreatite aguda. ....	87

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Guia de cores para identificação dos tubos de colheita. <sup>4</sup> .....	3
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros avaliados no hemograma. ....	10
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros avaliados no hemograma e respectivas doenças associadas ao aumento e diminuição dos valores de cada um. ....	12
<b>Tabela 4.</b> Exemplo de resultados obtidos para a detecção de Anticoagulante Lúpico segundo o método do Tempo de Veneno de Víbora de Russel (DRVVT). Resultado obtido através de BCS® XP Siemens.....	37
<b>Tabela 5.</b> Enzimas utilizadas no diagnóstico de patologia hepática.....	73
<b>Tabela 6.</b> Marcadores cardíacos utilizados no diagnóstico de enfarte do miocárdio. ....	80

## Índice de Equações

<b>Equação 1.</b> <i>International Normalized Ratio</i> (INR) .....	29
<b>Equação 2.</b> Fórmula de cálculo do Anticoagulante Lúpico (AL) .....	36
<b>Equação 3.</b> Fórmula de cálculo da Clearance da Creatinina .....	63
<b>Equação 4.</b> Reação de quantificação da Creatinina .....	63
<b>Equação 5.</b> Reação de quantificação do Nitrogénio Ureico .....	64
<b>Equação 6.</b> Reação de quantificação do Ácido Úrico .....	65
<b>Equação 7.</b> Reação de quantificação das Proteínas Totais na urina.....	65
<b>Equação 8.</b> Reação para obtenção da concentração de Proteínas Totais .....	69
<b>Equação 9.</b> Reação para obtenção da concentração de Albumina .....	70
<b>Equação 10.</b> Reação para determinação da concentração da Bilirrubina Total .....	71
<b>Equação 11.</b> Reação para determinação da concentração da Bilirrubina Direta .....	72
<b>Equação 12.</b> Reações enzimáticas de determinação da quantidade de Colesterol Total na amostra .....	75
<b>Equação 13.</b> Reações enzimáticas para doseamento dos Triglicéridos .....	76
<b>Equação 14.</b> Reação de quantificação do Colesterol HDL .....	77
<b>Equação 15.</b> Equação de Friedewald.....	77
<b>Equação 16.</b> Equações da reação de quantificação do Colesterol LDL .....	78
<b>Equação 17.</b> Reações de determinação da atividade enzimática da Glucose Hexoquinase .....	81
<b>Equação 18.</b> Reações de determinação da Frutosamina .....	83
<b>Equação 19.</b> Reação de determinação da concentração de Ferro Sérico.....	84
<b>Equação 20.</b> Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC) .....	85
<b>Equação 21.</b> Determinação da atividade enzimática da Amilase pancreática.....	87
<b>Equação 22.</b> Determinação da atividade enzimática da Lipase .....	88
<b>Equação 23.</b> Determinação do Cálcio ionizado.....	92
<b>Equação 24.</b> Reação para determinação do Fósforo Inorgânico .....	93
<b>Equação 25.</b> Reação de determinação da concentração de Magnésio Total.....	94

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>AEQ</b>	Avaliação Externa da Qualidade
<b>AL</b>	Anticoagulante Lúpico
<b>ALP</b>	Fosfatase Alcalina
<b>ALT</b>	Alanina Amino-Transferase
<b>AMA</b>	Autoanticorpos Anti-Mitocôndria
<b>ANA</b>	Anticorpos antinucleares
<b>ANCA</b>	Autoanticorpos Anti Citoplasma dos Neutrófilos
<b>Anti-Tg</b>	Anticorpo Anti-Tiroglobulina
<b>APC</b>	Proteína C ativada
<b>APTT</b>	Tempo de tromboplastina parcial ativado
<b>Arg506</b>	arginina na posição 506
<b>ASMA</b>	Autoanticorpos anti-musculatura lisa
<b>AST</b>	Aspartato Amino-Transferase
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>aTPO</b>	Anticorpo anti-peroxidase da tiroide
<b>BCG</b>	Verde de bromocresol
<b>c-ANCA</b>	ANCA citoplasmático
<b>CBP</b>	Colangite biliar primária
<b>CHGM</b>	Concentração de hemoglobina globular média
<b>CK</b>	Creatina quinase
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CPC</b>	Orto-cresolftaleína-complexona
<b>CXP2D6</b>	Citocromo P4502D6
<b>DCV</b>	Doença cardiovascular
<b>DIC</b>	Coagulação Intravascular Disseminada
<b>DIT</b>	Diiodotirosina
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DRVV</b>	Veneno de víbora Russel diluído
<b>DRVVT</b>	Tempo de Veneno de Víbora de Russel
<b>EBV</b>	Vírus Epstein-Barr
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetraacético dissódico
<b>FDP</b>	Produtos de degradação da fibrina
<b>fL</b>	Fentolitros
<b>FR</b>	Fator Reumatoide
<b>FT3</b>	Triiodotironina Livre
<b>FT4</b>	Tiroxina Livre
<b>FTCD</b>	Antigénio formiminotransferaseciclodes-aminase
<b>FvW</b>	Fator de Von Willebrand
<b>GAH</b>	Globulina anti-humana
<b>GFR</b>	Grau de filtração glomerular
<b>GGT</b>	$\gamma$ -Glutamilttransferase
<b>HAI</b>	Hepatite autoimune
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	Hemoglobina glicada
<b>HCT</b>	Hematócrito
<b>HDL</b>	<i>High-density lipoproteins</i>
<b>HEp-2</b>	Células epiteliais humanas
<b>HGM</b>	Hemoglobina globular média
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HPLC</b>	<i>High-Perfomance Liquid Chromatography</i>
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>INR</b>	<i>International Normalized Ratio</i>
<b>ISI</b>	<i>International Sensitivity Index</i>
<b>LBA</b>	Lavado bronquioalveolar
<b>LC-1</b>	Autoanticorpo anti antigénio citosol hepático tipo 1
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano

<b>LDH</b>	Lactato Desidrogenase
<b>LDL</b>	<i>Low-density lipoproteins</i>
<b>LES</b>	Lupus Eritematoso Sistémico
<b>LKM-1</b>	Autoanticorpo anti microsomas fígado-rim
<b>MIT</b>	Monoiodotirosina
<b>MPA</b>	Poliangite Microscópica
<b>MPO</b>	mieloperoxidase
<b>NAD</b>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido
<b>NK</b>	Células <i>natural killer</i>
<b>NPN</b>	Composto nitrogenado não proteico
<b>NRBC</b>	<i>Nucleated red blood cells</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>p-ANCA</b>	ANCA perinuclear
<b>PC</b>	Proteína C
<b>PDW</b>	Distribuição Plaquetária
<b>pg</b>	picogramas
<b>pNA</b>	para-nitroanilina
<b>PR3</b>	proteinase-3
<b>PS</b>	proteína S
<b>PT</b>	Taxa de Protrombina
<b>PTGO</b>	Prova de tolerância à glucose oral
<b>PTH</b>	Hormona da paratiroide
<b>PTT</b>	Tempo de tromboplastina
<b>RBC</b>	<i>Red blood cells</i>
<b>RDW</b>	Coefficiente de dispersão do volume eritrocitário
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RPR</b>	<i>Rapid Plasma Reagin</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
<b>T3</b>	Triiodotironina
<b>T4</b>	Tiroxina
<b>TBG</b>	Globulina ligante da tiroxina
<b>Tg</b>	Tiroglobulina
<b>TIBC</b>	Capacidade total de fixação do ferro
<b>TPHA</b>	<i>T. pallidum-particle agglutination</i>
<b>TPO</b>	Tiroide Peroxidase
<b>TRH</b>	Hormona libertadora da tirotrponina
<b>TSH</b>	Hormona estimulante da tiroide
<b>TT</b>	Tempo de Trombina
<b>VCS</b>	Volume, condutividade, scatter
<b>VDRL</b>	<i>Venereal Disease Research Laboratories</i>
<b>VGM</b>	Volume globular médio
<b>VLDL</b>	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
<b>VPM</b>	Volume Plaquetar Médio
<b>VS</b>	Velocidade de Sedimentação
<b>VSM47</b>	Células musculares lisas vasculares
<b>VVR</b>	Veneno de víbora Russel
<b>WBC</b>	<i>White blood cells</i>

[Página intencionalmente deixada em branco]

## **Introdução**

O presente relatório de estágio reflete todos os conhecimentos que adquiri durante o estágio curricular realizado no Laboratório Central da SYNLAB, em Lisboa, no contexto do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O meu estágio foi orientado pela Doutora Anabela Marques Sousa, especialista em Ciências Farmacêuticas pela Ordem dos Farmacêuticos.

O estágio curricular teve uma duração de 745 horas, distribuídas pelas áreas da Fase Pré-Analítica, Hematologia, Imunologia e Bioquímica. Teve início a 3 de fevereiro de 2020, terminando no dia 18 de setembro do mesmo ano. Em março de 2020, devido à pandemia por SARS-Cov-2, o estágio foi interrompido tendo sido retomado em junho de 2020.

A marca SYNLAB resulta da fusão das empresas synlab e Labco fundadas em 1998 e 2004, respetivamente. Partilhando as mesmas estratégias e valores, originaram uma única empresa cujo objetivo é oferecer um serviço rápido e de elevada qualidade. Tendo como foco não só o cliente, mas também o colaborador, a SYNLAB oferece a oportunidade de desenvolvimento profissional e pessoal a todos os funcionários.

Esta empresa faculta uma abordagem multidisciplinar nas áreas das medicinas humana e veterinária, indústria farmacêutica e análises ambientais, permitindo um diagnóstico rápido, preciso e eficiente.

A realização deste estágio curricular permitiu-me aprofundar os conhecimentos adquiridos durante o primeiro ano de mestrado, para além de adquirir uma perceção real do funcionamento de um laboratório de análises clínicas. Acompanhei todo o processo analítico desde a colheita da amostra até à obtenção do resultado final, sendo possível compreender a tamanha complexidade de todo o processo. Além do mais, acredito terem-me sido dadas as ferramentas necessárias ao ingresso no mercado de trabalho nesta área.

## **Fase Pré-Analítica**

A Fase Pré-Analítica do processo de testagem começa quando o teste é requisitado e termina quando o mesmo começa. Estima-se que 70% dos erros verificados no processo analítico sejam devidos a esta fase. Diversos fatores pré-analíticos conduzem a esses mesmos erros como a realização de más colheitas, identificação errada de amostras e até mesmo fatores inerentes ao utente, como a sua idade e dieta. <sup>1,2</sup>

A influência dos fatores pré-analíticos e respetivos erros pode comprometer a qualidade da amostra e implicar repetição de colheita. É, por esse motivo, importante estabelecer um protocolo de qualidade como forma de mitigação assegurando a veracidade dos resultados obtidos assim como o bem-estar do utente. <sup>2</sup>

Toda a informação referente ao processo de colheita de amostras está presente no Manual de Colheitas do laboratório.

## **Colheita de Amostras**

O utente, antes da colheita, deverá ser informado de como deverá proceder antes da realização da mesma. Na maioria das colheitas, é pedido ao doente que permaneça em jejum até à recolha do produto biológico o que se deve ao facto dos valores de referência terem por base esta condição. No entanto, em alguns analitos é necessário um jejum mais curto como é o caso do doseamento do colesterol total, onde o jejum é de quatro horas.

Para além disso, o utente é responsável pela recolha de algumas amostras como urina e fezes. Nestes casos, é crucial assegurar que o procedimento de colheita é executado segundo as normas do Manual de Colheitas de modo a mitigar possíveis erros analíticos.

## Venipunctura

A Venipunctura consiste no processo mais comum de recolha de amostras de sangue. A colheita de sangue pode ser realizada em sistema aberto, onde são utilizadas seringa e agulha, e em sistema fechado a vácuo onde a amostra é colhida diretamente da veia para o tubo. <sup>3</sup>

O sistema de colheita fechado a vácuo é composto por agulha, tubo de evacuação e um adaptador que é utilizado para segurar a agulha e o tubo. A agulha ao puncionar a veia faz com que a pressão de vácuo exercida no tubo permita o fluxo de sangue para o mesmo. <sup>4</sup> Este é um método bastante vantajoso porque possibilita a diminuição do risco de hemólise e previne a contaminação da amostra.

**Tabela 1.** Guia de cores para identificação dos tubos de colheita. <sup>4</sup>

Cor da Tampa	Aditivo	Número de inversões na colheita de sangue	Uso em Laboratório
<b>Roxo</b> 	Revestido por spray de EDTA K <sub>2</sub>	8	Determinações de hematologia em sangue total.
<b>Vermelho</b> 	Ativador do coágulo, revestimento de silicone	5	Determinações bioquímicas em soro.
<b>Amarelo</b> 	Ativador do coágulo e gel para a separação do soro	5	Determinações bioquímicas em soro.
<b>Azul-Claro</b> 	Citrato de Sódio	3-4	Avaliação da coagulação em plasma.
<b>Verde</b> 	Heparina de Lítio	8	Determinações bioquímicas em plasma.
<b>Cinzento</b> 	Fluoreto de Sódio	8	Determinações de glucose.
<b>Azul-Escuro</b> 	Ativador do Coágulo	8	Determinação de metais, toxicologia.

Em ambos os sistemas de colheita, e para cada utente em particular, é selecionado um conjunto de tubos de colheita de acordo com os parâmetros a analisar. Esses tubos são identificados pelas cores das suas tampas que indicam o tipo de aditivo que apresentam ou ausência do mesmo. O código de cores dos tubos utilizados em venipunctura é universal, o que permite uma uniformização do processo de colheita.

Um aditivo tem como principais funções a prevenção da coagulação e preservação de determinados componentes do sangue. <sup>1</sup> Para que a sua função seja cumprida, o tubo deverá ser preenchido até à marca presente que assim o indica. Se tal não se verificar, a proporção sangue/aditivo é afetada e, por consequência, a qualidade da amostra comprometida. Para além disso, os tubos devem ser colhidos segundo uma sequência específica, o que reduz a contaminação da amostra pelos diversos aditivos.

A ordem de distribuição das amostras pelos tubos é estabelecida pelas normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e é utilizada qualquer que seja o sistema de colheita utilizado:

1. Tubos Estéreis utilizados em cultura de sangue;
2. Tubos de Soro com ou sem ativador de coágulo, com ou sem gel separador;
3. Tubos de Citrato de Sódio;
4. Tubos de Heparina de Lítio;
5. Tubos de EDTA;
6. Tubos contendo antiglicolíticos.

### **Procedimento de Colheita de Amostras de Sangue**

O processo de colheita de amostras de sangue inicia-se com a confirmação dos dados do utente, sendo-lhe pedido que diga o seu nome completo, data de nascimento e número de telefone. Consoante as análises pedidas, o utente é interrogado acerca do seu jejum e medicação que possa tomar, assim como pela entrega de outros produtos biológicos requeridos como urina e fezes.

O flebotomista procede à colocação dos rótulos de identificação do utente nos respetivos tubos na presença do mesmo. Procede-se à colocação de luvas para proteção individual e do utente.

São escolhidos o local de punção e o material necessário. Esta área é desinfetada com álcool a 70%. O técnico de colheitas coloca o garrote no braço a puncionar a cerca de sete a dez centímetros do local de punção.

Após a punção, é aliviado o garrote e é pedido ao utente que abra lentamente a mão. Os tubos devem ser preenchidos até ao volume indicado no próprio. O local de punção é pressionado com algodão, devendo o braço manter-se esticado e elevado. Por fim, é colocado um penso rápido.

Os tubos colhidos deverão ser homogeneizados de imediato, suavemente, de modo a garantir a mistura da amostra com o aditivo presente. Devem ser tidas em conta todas as indicações de processamento das amostras, como por exemplo, no doseamento dos níveis de bilirrubina a amostra deve ser protegida da luz.

Todo o material descartável utilizado no processo deverá ser colocado nos respetivos contentores de biossegurança.

Deve garantir-se que o utente se encontra bem e informá-lo que não deverá esforçar o braço puncionado nas próximas duas horas. Após a saída, o gabinete e o material deverão ser desinfetados de modo a receber o próximo utente em segurança.

### **Transporte de Amostras**

O transporte de sangue, urina, fluidos corporais e amostras teciduais do local de colheita para o laboratório é um componente bastante importante do processo pré-analítico. <sup>2</sup> As amostras são transportadas dentro de malas específicas para o efeito, contendo as condições de conservação necessárias à manutenção da sua estabilidade.

O fator mais importante no transporte é a temperatura. A temperatura é mantida através da utilização de malas isotérmicas, termoacumuladores e de sistemas individuais de transporte de produtos em ambiente de congelação.

Os produtos biológicos podem ser transportados em três tipos de ambientes: temperatura ambiente controlada, temperatura ambiente estrita e ambiente de congelação.

O transporte em temperatura ambiente controlada tem como objetivo minimizar a influência da temperatura externa no interior da mala. Isto consegue-se através da

utilização de termoacumuladores previamente congelados cujo papel é controlar a temperatura interior.

O transporte em condições de temperatura ambiente estrita é efetuado em casos em que as amostras não devem ter contato com termoacumuladores, devendo manter-se a uma temperatura ambiente situada entre os 18 e 24°C. Estas amostras devem ser transportadas individualmente, como é o caso das hemoculturas.

Por fim, amostras instáveis devem ser transportadas em ambiente de congelação até ao laboratório, como é o caso da amónia, fosfatase ácida e renina plasmática.

<sup>2</sup> Este ambiente é mantido através de sistemas individuais de transporte em ambiente de congelação. Este tipo de produto biológico deve ser mantido congelado até ao momento de envio e permanecer em contato com o termoacumulador congelado.

Para além da temperatura, é essencial assegurar o correto transporte das malas. Deve evitar-se o agitação excessivo, o que pode provocar a hemólise das amostras, e proteger os produtos biológicos da exposição direta à luz, evitando a quebra de determinados analitos como a bilirrubina. <sup>2</sup>

### **Receção de Produtos Biológicos**

A receção de produtos biológicos realiza-se na secção da Triagem no Laboratório. Nesta secção são recebidas as malas provenientes dos Postos de Colheita procedendo-se à sua abertura e medição da temperatura interior.

As malas transportadoras chegam ao laboratório fechadas sendo abertas por um colaborador da secção de Triagem. Após a sua abertura, é medida a temperatura interna que se baseia nas medições da temperatura ambiente dentro da mala e a temperatura junto ao termoacumulador. Em condições de transporte em temperatura ambiente estrita, a temperatura deverá permanecer entre os 18 e 24°C. Em malas refrigeradas, onde existe uma segunda mala isotérmica, as temperaturas deverão situar-se entre os -5 e 15°C.

## **Triagem de Produtos Biológicos**

Uma vez abertas as malas, as amostras no seu interior são distribuídas pelas várias secções analíticas do laboratório. A triagem tem como principal objetivo dar entrada dos produtos biológicos no sistema através da identificação pelo leitor de código de barras, de modo que se possa iniciar o processo analítico. Adicionalmente, procede à divisão das amostras em alíquotas quando necessário.

O processo de triagem pode ser manual ou feito de forma automática. As amostras de hematologia, microbiologia, amostras congeladas, repetições de colheita e amostras de hemodiálise são triadas manualmente e encaminhadas às respetivas secções. A triagem automática é executada pelo equipamento AUTOMATE® 2550 e aplica-se aos tubos de soro.

## **Centrifugação de Amostras**

Uma centrífuga é um equipamento que rotaciona sangue e outras amostras a um número elevado de rotações por minuto (RPM). A força centrífuga gerada provoca a separação das células e plasma ou soro em amostras de sangue. Amostras de soro e plasma devem ser centrifugadas antes da análise. <sup>1</sup>

É importante que os tubos sejam colocados na centrífuga de acordo com o seu peso e tamanho em posições opostas, de modo a assegurar o equilíbrio apropriado ao processo. Se tal não acontecer, podem originar-se danos na centrífuga, mas principalmente, na amostra. <sup>2</sup>

As amostras de plasma devem ser centrifugadas sem demora enquanto as amostras de soro devem estar completamente coaguladas antes do processo de centrifugação. Se a coagulação não estiver completa, ocorre a formação de fibrina o que pode interferir com o doseamento do analito. <sup>1</sup>

A centrifugação das amostras de sangue é um fator pré-analítico bastante importante na manutenção da integridade da mesma. No entanto, é necessário existir uma padronização do tempo de centrifugação dos diversos produtos biológicos de modo a assegurar a obtenção de resultados fiáveis. Por exemplo, em testes de coagulação, tempos de centrifugação inferiores a quinze minutos podem implicar uma separação incompleta do plasma havendo acumulação de plaquetas.

## **Crítérios de Rejeição e Aceitação de Amostras**

Todas as amostras devem ser colhidas, rotuladas, transportadas e processadas de acordo com os procedimentos estabelecidos que incluem o volume de amostra, cuidados especiais de colheita e tipo de tubo. Uma amostra deve ser rejeitada e pedida repetição de colheita sempre que a mesma não esteja corretamente identificada, quando o volume de amostra é inadequado ao tubo de colheita, quando se verifica a presença de hemólise ou sempre que o produto biológico seja colhido no tubo errado.<sup>1,2</sup>

## **Hematologia**

A Hematologia é a área laboratorial responsável pelo estudo do sangue e dos seus componentes. Tem como objeto de estudo os elementos figurados do sangue, como os eritrócitos, leucócitos e plaquetas, bem como os órgãos hematopoiéticos e linfáticos, como a medula óssea, timo, amígdalas, gânglios linfáticos, entre outros.

Um laboratório de Hematologia apresenta um papel primordial no diagnóstico de patologias do foro sanguíneo, na monitorização dos efeitos de determinadas terapêuticas, assim como execução de análises de rotina.

Muitas são as análises requeridas nesta área de estudo, sendo o Hemograma, Velocidade de Sedimentação, Hemoglobina Glicada, Hemostase e Coagulação, e Imunofenotipagem as mais realizadas por um laboratório de Hematologia.

No presente capítulo deste relatório serão descritas algumas das técnicas utilizadas na realização da análise dos referidos parâmetros.

## **Contagem Automática de Células Sanguíneas**

O UniCel<sup>®</sup> DxH 800 series da Beckman Coulter<sup>®</sup> é um analisador hematológico automático cujo design eletrónico e mecânico permite executar a análise do hemograma, análise diferencial de leucócitos, eritrócitos nucleados (NRBC) e reticulócitos.<sup>7</sup>

A amostra de sangue total aspirada é dividida em duas alíquotas, sendo cada uma misturada com um diluente isotónico. A primeira diluição é colocada na câmara correspondente aos eritrócitos (RBC), e a segunda na câmara dos leucócitos (WBC).<sup>4</sup>

Os eritrócitos e plaquetas são contados e discriminados através de impedância elétrica. As partículas cujo tamanho esteja compreendido entre os 2 e 20 fL são contadas como plaquetas, e as com tamanho superior a 36 fL são contabilizadas como eritrócitos. À câmara de análise de leucócitos é adicionado um reagente que lisa os eritrócitos libertando a hemoglobina. Os WBC são contados, simultaneamente, por impedância elétrica. Após os ciclos de contagem estarem completos, a segunda diluição é transferida para o hemoglobinómetro para determinação da concentração de hemoglobina. <sup>4</sup>

Este equipamento automático recorre à tecnologia VCS (volume, condutividade, scatter) num canal separado para realizar uma análise diferencial das cinco populações leucocitárias. Esta tecnologia incluiu o dimensionamento volumétrico das células por impedância, a medição da condutividade celular e o espalhamento da luz laser, tudo realizado em simultâneo para cada célula analisada. A combinação destas tecnologias permite obter um gráfico tridimensional das populações leucocitárias. <sup>4</sup>

Na análise diferencial das populações leucocitárias, são utilizados alarmes ou indicadores de anomalias. Um deles, definido pelo utilizador, alerta acerca de anomalias na distribuição celular, como a eosinofilia ou linfocitopenia, tendo por base a contagem absoluta das respetivas células. Outro dos indicadores avisa o utilizador sobre anomalias morfológicas como, por exemplo, granulócitos imaturos, blastos, agregados plaquetários, entre outros. <sup>4</sup>

O controlo de qualidade interna tem como finalidade a medição da precisão do método a executar. De modo a assegurar a qualidade das análises a processar no equipamento referido, em cada início de sessão de trabalho e quando o volume de amostras processadas é já elevado, são utilizados três tipos de controlos: um controlo normal e dois controlos patológicos, um baixo e outro alto. Os controlos utilizados são fornecidos pela casa comercial.

Para além dos controlos referidos, é processado um controlo que assegura a reprodutibilidade do equipamento. Este controlo consiste numa amostra cujos valores são conhecidos.



**Figura 1.** UniCel® DxH 800 series. Conjunto de três equipamentos alinhados em cadeia (**direita**). O equipamento UniCel® DxH Slidemaker Stainer (**esquerda**) executa esfregaços de sangue e respetiva coloração.

(Fonte: Autoria da Própria)

## Hemograma

O hemograma consiste num painel de testes realizado em sangue total onde é realizada a contagem total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, concentração de hemoglobina e hematócrito. Para além destes parâmetros, são também analisados índices eritrocitários tais como a hemoglobina globular média (HGM), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e coeficiente de dispersão do volume eritrocitário (RDW).

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados no hemograma.

Parâmetros	Descrição	Determinação
<b>Hemoglobina</b>	Proteína conjugada que serve como veículo para o transporte de oxigénio e dióxido de carbono. É um teste bastante importante na deteção de anemias. <sup>2</sup>	Na determinação da hemoglobina, quer manualmente ou por meios automáticos, é utilizado o método da cianometahemoglobina. O sangue é diluído numa solução alcalina de ferricianeto de potássio, cianeto de potássio, bicarbonato de sódio e surfactante. A hemoglobina é oxidada a meta-hemoglobina (Fe <sup>3+</sup> ) pelo ferricianeto de potássio. O cianeto de potássio converte a meta-hemoglobina a cianometahemoglobina. A absorvância deste produto final a 540 nm é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina. <sup>4</sup>
<b>Hematócrito (HCT)</b>	Razão entre o volume de eritrócitos e o volume de sangue total. <sup>2</sup>	Os instrumentos laboratoriais calculam este parâmetro a partir da contagem total de eritrócitos e do volume globular médio através da seguinte fórmula:  <i>Hematócrito = RBC × Volume Globular Médio (VGM)</i>
<b>Volume Globular Médio (VGM)</b>	Volume médio do eritrócito, expresso em femtolitros (fL). É medido por analisadores hematológicos automáticos com base na impedância elétrica ou na dispersão de luz. <sup>8</sup>	<i>Volume Globular Médio (VGM)</i> $= \frac{HCT (\%) \times 10}{Contagem\ de\ RBC \left( \times \frac{10^{12}}{L} \right)}$

Relatório de Estágio – Mariana Teles

<p><b>Hemoglobina Globular Média (HGM)</b></p>	<p>Peso médio da hemoglobina num eritrócito, expresso em picogramas (pg).<sup>4</sup></p>	<p><i>Hemoglobina Globular Média (HGM)</i></p> $= \frac{Hb \left(\frac{g}{dL}\right) \times 10}{\text{Contagem de RBC} \left(\times \frac{10^{12}}{L}\right)}$
<p><b>Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)</b></p>	<p>Concentração média de hemoglobina em cada eritrócito. É calculada através da concentração total de hemoglobina e do hematócrito.<sup>8</sup></p>	<p><i>Concentração de Hemoglobina Globular Média</i></p> $= \frac{Hb \left(\frac{g}{dL}\right) \times 100}{HCT (\%)}$
<p><b>Distribuição de Eritrócitos (RDW)</b></p>	<p>Coefficiente de variação do volume dos eritrócitos.<sup>9</sup></p>	<p>É um índice eritrocitário computadorizado obtido a partir do histograma das células sanguíneas vermelhas.<sup>9</sup></p>
<p><b>Contagem de Reticulócitos</b></p>	<p>Células sanguíneas jovens que contêm RNA citoplasmático. A contagem destas células mede a rapidez com que os reticulócitos são produzidos pela medula óssea e libertados para a corrente sanguínea.<sup>8</sup></p>	<p>A contagem absoluta de reticulócitos corresponde ao número real destas células num litro ou microlitro de sangue.<sup>8</sup></p> $\text{Contagem Absoluta de Reticulócitos} = \frac{\text{reticulócitos} (\%) \times RBC \left(\times \frac{10^{12}}{L}\right)}{100}$ <p>Em amostras com um hematócrito baixo, a percentagem de reticulócitos pode estar falsamente elevada devido ao facto de o sangue total conter apenas alguns eritrócitos. É utilizado um fator de correção que considera um hematócrito normal médio de 45%.<sup>4</sup></p> $\text{Contagem Correta de Reticulócitos} (\%) = \text{reticulócitos} (\%) \times \frac{(HCT \text{ do doente} (\%))}{45}$
<p><b>Índices Plaquetários</b></p>	<p>O Volume Plaquetar Médio (VPM) é um índice plaquetário que deriva da distribuição de tamanho das plaquetas na curva obtida por impedância elétrica. Outros parâmetros plaquetários podem ser computadorizados por contadores automáticos incluindo a Distribuição Plaquetária (PDW), que mede a anisocitose plaquetária, e o Trombócrito que é o produto do VPM e da contagem de plaquetas.<sup>10</sup></p>	<p style="background-color: #cccccc;"></p>

## Relatório de Estágio – Mariana Teles

**Tabela 3.** Parâmetros avaliados no hemograma e respectivas doenças associadas ao aumento e diminuição dos valores de cada um. <sup>8</sup>

<b>Parâmetros Avaliados no Hemograma</b>		
	<b>Aumento</b>	<b>Diminuição</b>
<b>Eritrócitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Policitemia secundária</li> <li>• Hemoconcentração</li> <li>• Policitemia Vera</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia</li> <li>• Aglutininas frias</li> </ul>
<b>Leucócitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecções agudas</li> <li>• Leucemias agudas e crônicas</li> <li>• Distúrbios Inflamatórios</li> <li>• Linfoma circulante</li> <li>• Lesão/necrose dos tecidos</li> <li>• Alergias</li> <li>• Reações de hipersensibilidade</li> <li>• Fumadores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecções</li> <li>• Mielosupressão</li> <li>• Mielodisplasia</li> <li>• Hiperesplenismo</li> <li>• Neutropenia autoimune</li> <li>• Alcoolismo</li> </ul>
<b>Hemoglobina e Hematócrito</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemoconcentração</li> <li>• Policitemia</li> <li>• Exercício físico intenso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia Macroscítica (doença hepática, deficiência em vitamina B<sub>12</sub>, deficiência em folatos)</li> <li>• Anemia Normocítica (deficiência em ferro precoce, anemia da doença crônica, infiltrado de medula óssea)</li> <li>• Anemia Microcítica (deficiência em ferro, talassemia)</li> </ul>
<b>Volume Globular Médio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doença Hepática</li> <li>• Alcoolismo</li> <li>• Hemocromatose</li> <li>• Anemia megaloblástica</li> <li>• Mielodisplasia</li> <li>• Reticulocitose</li> <li>• Contagem de leucócitos elevada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deficiência em ferro</li> <li>• Talassemia</li> <li>• Anemia sideroblástica</li> <li>• Esferocitose hereditária</li> <li>• Anemia da doença crônica</li> </ul>
<b>Hemoglobina Globular Média</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macrocitose</li> <li>• Hemocromatose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microcitose (deficiência em ferro, talassemia)</li> <li>• Hipocromia (anemia sideroblástica, anemia da doença crônica)</li> </ul>
<b>Concentração de Hemoglobina Globular Média</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esferocitose marcada</li> <li>• Aumento da autoaglutinação</li> <li>• Hemólise</li> <li>• Lipemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia Hipocrômica (deficiência em ferro, talassemia)</li> <li>• Anemia Sideroblástica</li> <li>• Anemia da Doença Crônica</li> </ul>
<b>Contagem de Reticulócitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia Hemolítica</li> <li>• Perda de Sangue</li> <li>• Recuperação de deficiência em ferro, vitamina B<sub>12</sub> ou folatos</li> <li>• Anemia induzida por drogas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia ferropênica</li> <li>• Anemia aplástica</li> <li>• Anemia da doença crônica</li> <li>• Anemia megaloblástica</li> <li>• Anemia sideroblástica</li> <li>• Síndrome Mielodisplásico</li> </ul>
<b>Plaquetas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distúrbios Mieloproliferativos (Policitemia Vera, Leucemia Mieloide Crônica, Trombocitemia Essencial, Mielofibrose)</li> <li>• Distúrbios Mielodisplásicos</li> <li>• Trombocitose reativa secundária a distúrbios inflamatórios</li> <li>• Deficiência em ferro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Decréscimo na produção: supressão da medula óssea, mielodisplasia, quimioterapia</li> <li>• Aumento da destruição ou agrupamento excessivo: Hiperesplenismo, DIC, anticorpos plaquetários</li> </ul>

## **Esfregaço de Sangue Periférico**

Um esfregaço de sangue fornece informação bastante importante sobre a saúde de um indivíduo. A sua observação permite avaliar possíveis alterações existentes na série vermelha e populações leucocitárias contribuindo para a formulação de um diagnóstico clínico.

A execução de um esfregaço sanguíneo pode ser realizada manualmente ou através de métodos automáticos. A coloração mais comumente utilizada é a coloração de Romanowsky ou de Wright-Giemsa, sendo aplicada em esfregaços de sangue periférico e de medula óssea. É considerada uma coloração policromática devido à presença de eosina e azul de metileno.<sup>4</sup>

O azul de metileno, um corante básico, confere uma cor azul-violeta aos ácidos nucleicos, à nucleoproteína, aos grânulos de basófilos e, fracamente, aos grânulos de neutrófilos. A eosina, um corante ácido, transmite uma cor vermelha ou laranja à hemoglobina e grânulos de eosinófilos ligando-se também à proteína nuclear catiónica, dando coloração ao núcleo.<sup>11</sup>

A coloração das células e dos seus componentes ocorre apenas quando é adicionado uma solução tampão. O azul de metileno oxidado e a eosina formam um complexo tiazina-eosinato, que cora os componentes celulares neutros.<sup>4</sup>

Devido ao aumento do fluxo de trabalho nos laboratórios de hematologia, a execução de esfregaços de sangue é automatizada. Os processos de fixação, coloração e tamponamento seguem os mesmos princípios que a coloração manual.

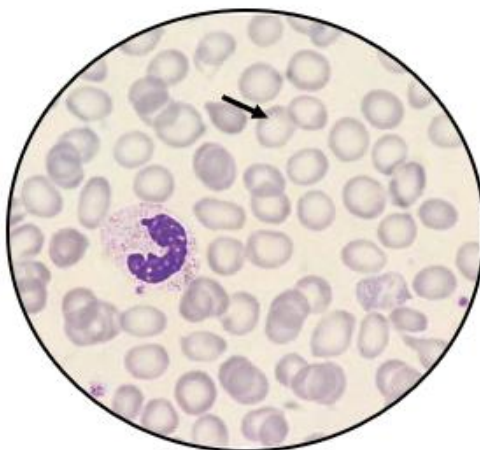
### **Observação da Série Vermelha**

A avaliação da série vermelha consiste na observação de diversos parâmetros como o conteúdo de hemoglobina, tamanho e forma das células, presença de inclusões eritrocitárias, entre outros.

Normocromia é um termo utilizado para um conteúdo de hemoglobina normal. Quando a quantidade desta proteína se encontra diminuída, surge a hipocromia que se manifesta pelo aparecimento de um halo claro nos eritrócitos, estando o HGM e CHGM também diminuídos. Pelo contrário, quando existe uma concentração elevada de hemoglobina surge “Hiperocromia”, ou seja, os eritrócitos encontram-se carregados desta proteína podendo assumir uma forma esférica originando esferócitos. Nestes casos, o HGM encontra-se aumentado e o CHGM normal. Por vezes, podem surgir numa lâmina

eritrócitos normocrômicos e hipocrômicos sendo esta condição denominada de anisocromia. <sup>2</sup>

Quanto ao tamanho, os eritrócitos podem ser classificados como normocíticos, quando exibem um tamanho normal, microcíticos, quando apresentam um tamanho inferior, e como macrocíticos, quando são maiores do que o normal. Nestas situações, o VGM encontra-se alterado.

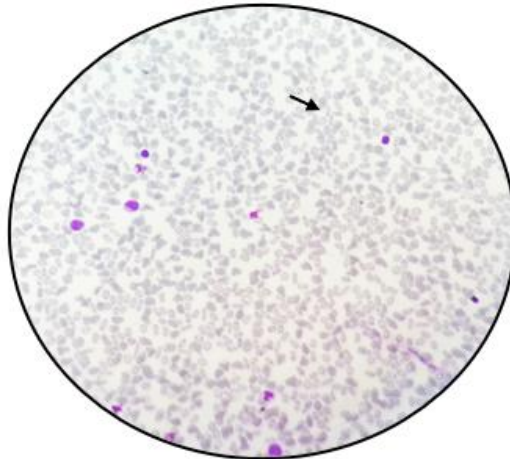


**Figura 2.** Microcitose num doente com traço de  $\beta$  Talassemia. Observa-se hipocromia, anisocitose e poiquilocitose.

(Adaptado de: "Blood Cells- A Practical Guide", 5ªedição, 2015)

No que diz respeito à forma, a poiquilocitose corresponde a uma situação em que existe um aumento da proporção de células com uma forma anómala. Esta alteração de forma é comum em patologias do foro hematológico. Pode resultar da produção anómala na medula óssea ou do dano das células após a sua libertação na corrente sanguínea. <sup>11</sup>

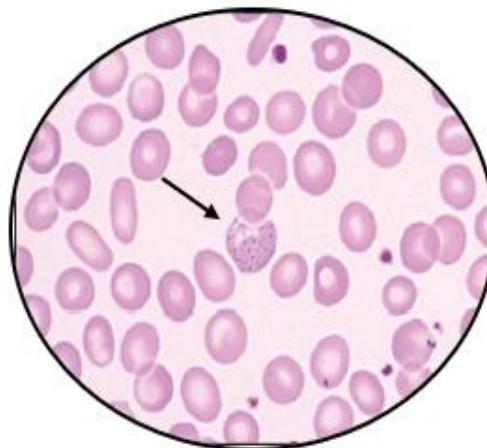
Algumas das formas mais comumente assumidas são as eliptocítica e esferocítica. Os eliptócitos são bastante abundantes na eliptocitose hereditária. Para além disso, são comuns em casos de anemia ferropénica, anemia megaloblástica e anemia falciforme. Os esferócitos são encontrados na esferocitose hereditária, assim como em casos de anemia hemolítica autoimune. <sup>2</sup>



**Figura 3.** Esfregaço de sangue periférico. Observa-se a presença de eliptocitose hereditária (→).

(Fonte: Autoria da Própria)

Para além das características morfológicas, podem ser observadas na série vermelha diversos tipos de inclusões eritrocitárias tais como o pontuado basófilo e corpos de Howell-Jolly. O pontuado basófilo é caracterizado pela presença de vários grânulos basófilos dentro do eritrócito. É observado no envenenamento por chumbo e em doenças em que a síntese de Hb está diminuída, como na anemia megaloblástica. Os corpos de Howell-Jolly são partículas lisas e redondas de cromatina nuclear que surgem em casos de anemia hemolítica, anemia megaloblástica e após esplenectomia. <sup>2</sup>



**Figura 4.** Esfregaço de sangue periférico. Observa-se a presença de pontuado basófilo (→).

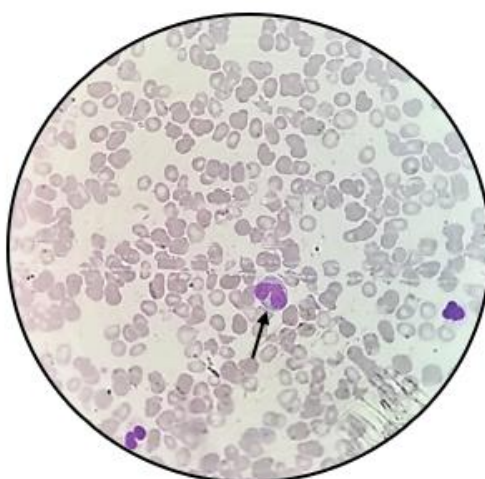
(Adaptado de: "Henry's Clinical Diagnostics and Management by Laboratory Methods", 23ª edição, 2017)

### **Observação das Populações Leucocitárias**

Na observação do esfregaço de sangue periférico, é observada a população leucocitária de modo a aferir se a contagem efetuada pelo equipamento hematológico automático está correta e se são observáveis características anômalas nas várias populações de leucócitos. É efetuada uma segunda contagem diferencial de forma manual em que são contabilizadas cem células brancas e classificadas de acordo com as suas características morfológicas. O resultado obtido é expresso em percentagem e permite determinar se os valores se encontram segundo os valores de referência.

Como referido anteriormente, a aparência das células leucocitárias é bastante importante e pode revelar a existência de determinadas patologias. Por exemplo, a presença de granulação tóxica, corpos de Döhle, linfócitos reativos e bastonetes de Auer deve ser referida no relatório laboratorial. <sup>4</sup>

Na contagem diferencial, deve ter-se em atenção a presença de células imaturas. Leucócitos imaturos não são normalmente observados no sangue periférico o que pode indicar a presença de infeções ou de uma leucemia. No caso dos neutrófilos, podem ser classificados como apresentando um desvio à esquerda ou um desvio à direita. As células linfocíticas ou monocíticas quando presentes, são referidas como promielócitos, linfoblastos, promonócitos ou monoblastos. Os basófilos e eosinófilos mais jovens são referidos como imaturos e são contados como células maduras. <sup>4</sup>



**Figura 5.** Esfregaço de sangue periférico de doente com Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mieloide Aguda. Observa-se a presença de um bastonete de Auer (→), característico destas patologias.

(Fonte: Autoria da Própria)

### **Influência do Anticoagulante no Esfregaço de Sangue**

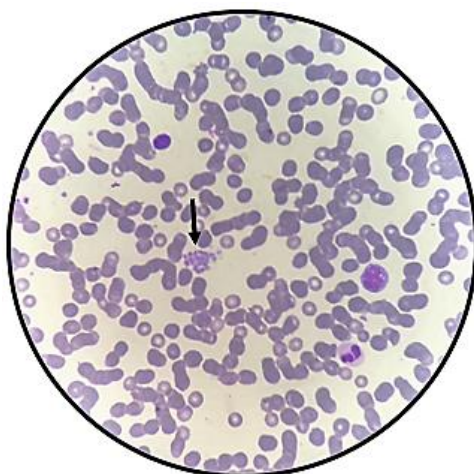
A maioria das amostras que chegam ao laboratório de Hematologia chegam em tubos que contêm ácido etilenodiaminotetraacético dissódico (EDTA), um anticoagulante que impede a coagulação sanguínea pela quelação do cálcio.

Contudo, algumas das amostras sofrem alterações por ação de reações de autoaglutinação com o EDTA. Esse tipo de acontecimentos altera os resultados do hemograma. Por exemplo, a formação de agregados plaquetários, visíveis no esfregaço, pode levar a um aumento da contagem de leucócitos o que conduz a falsos resultados.

De modo a evitar essas variações, é requerida a colheita de sangue em tubos contendo outro tipo de anticoagulante, como o citrato de sódio ou sulfato de magnésio. A utilização de sulfato de magnésio é bastante utilizada atualmente e permite, muitas das vezes, mitigar os efeitos provocados pelo EDTA.

A imagem apresentada em baixo corresponde a um esfregaço de sangue periférico de um doente cujos valores plaquetários se encontravam bastante baixos. Após a observação do mesmo, foi possível notar a presença de agregados plaquetários, o que indicava uma possível reação de autoaglutinação ao EDTA. A presença dos mesmos leva a uma Pseudotrombocitopénia. De modo a conferir de que era disso que se tratava, foi pedida uma repetição de colheita em tubo com sulfato de magnésio.

Se após a realização da colheita com novo anticoagulante se verificar, novamente, a presença de agregados plaquetários é aconselhada a colheita de sangue em tubo contendo outro anticoagulante junto do equipamento para determinar o valor real das plaquetas.



**Figura 6.** Esfregaço de sangue periférico. Observa-se a presença de agregados plaquetários (→).

(Fonte: Autoria da Própria)

## **Velocidade de Sedimentação**

A Velocidade de Sedimentação (VS) mede a taxa de sedimentação dos eritrócitos em plasma humano diluído. Este fenómeno depende de vários fatores tais como a composição proteica do plasma, a concentração de eritrócitos e forma dos mesmos. A VS consiste na distância em milímetros percorrida pelos eritrócitos numa hora. <sup>4,9</sup>

É um teste requerido em conjunto com outros parâmetros de modo a detetar e monitorizar o curso de doenças inflamatórias como a artrite reumatoide e infeções. Contudo, a VS não é um parâmetro específico das doenças inflamatórias estando elevada em outras situações como no mieloma plasmocítico, gravidez, anemia, entre outros. <sup>4</sup>

A VS é diretamente proporcional à massa de eritrócitos e inversamente proporcional à viscosidade plasmática. <sup>4</sup>

O aumento da VS pode indicar a presença de infeções como a osteomielite, neoplasmas malignos, paraproteinemias, anemia e gravidez. Todavia, um decréscimo na taxa de sedimentação dos eritrócitos pode evidenciar a presença de policitemia, anemia falciforme, esferocitose, anisocitose, entre outras condições. <sup>8</sup>

### **Método Modificado de Westergren**

O método de Westergren é o método de referência na medição da VS. Este método baseia-se no princípio de que a sedimentação dos eritrócitos no plasma fornece a medição do nível de proteínas de fase aguda e de inflamação. Embora este teste não seja específico de nenhuma doença em particular, permanece bastante útil a nível clínico no diagnóstico de várias doenças, através da monitorização da atividade de distúrbios inflamatórios ou de respostas a terapêuticas. <sup>12</sup>

Atualmente, o método de Westergren sofreu modificações sendo utilizado sangue com anticoagulante EDTA em vez de citrato. Esta substituição permite que seja utilizado o mesmo tubo que foi processado nas análises hematológicas anteriores. Para além disso, algumas das pipetas de VS sofreram uma diminuição do seu diâmetro interno e da respetiva graduação, o que permite que o método seja utilizado em amostras com pouco volume.

O método consiste na diluição da amostra colhida, anteriormente, em tubo contendo EDTA num tubo de hemólise contendo citrato de sódio. A solução obtida é colocada numa pipeta de VS até alcançar a marca correspondente ao zero. A pipeta é colocada

num suporte destinado à realização do método, suporte esse ao abrigo da luz e de oscilações. Passados sessenta minutos, é determinada a altura da coluna de plasma sendo expressa em milímetros.

### **Método Automatizado Alifax™ (Test-1™)**

O equipamento Alifax TM (Test-1 TM) determina o tamanho da reação de sedimentação num tubo de sangue através de uma agulha perfurante. O princípio do método consiste no estudo da capacidade de agregação dos eritrócitos por telometria. <sup>13</sup>

Os tubos para análise são colocados em suportes apropriados e são agitados durante cerca de dois minutos. Através da utilização de uma agulha de aspiração, o sangue passa do tubo original para um capilar e é centrifugado a uma velocidade de 20 G. O sistema utiliza um microfotómetro com um comprimento de onda de 950 nm. Os impulsos elétricos gerados são detetados por um detetor fotodiodo, correspondendo à agregação dos eritrócitos presentes em cada nível capilar. <sup>13</sup>

Para cada amostra é obtida uma curva de agregação e uma de sedimentação. O impulso elétrico medido por minuto define a curva de sedimentação. Os decréscimos do sinal médio por unidade de tempo juntamente com a raiz quadrada do sinal integral são transformados em valores de Westergren comparáveis. <sup>14</sup>

O controlo de qualidade interna do equipamento descrito é assegurado pela análise semanal de controlos provenientes da casa comercial. Para além disso, semanalmente, é analisada uma amostra de valor conhecido pelo aparelho. Esta análise tem como objetivo assegurar que o método se encontra a funcionar dentro dos parâmetros de qualidade estabelecidos e de que existe reprodutibilidade por parte do equipamento.



**Figura 7.** Alifax™ (Test-1™). Método automatizado de medição da velocidade de sedimentação.

(Fonte: A autoria da Própria)

## **Hemoglobina Glicada**

A hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) é o termo utilizado para descrever a formação de um composto hemoglobínico quando a glucose reage com o grupo amina da hemoglobina. A taxa de formação é diretamente proporcional à concentração plasmática de glucose. Como a semivida de um eritrócito é de cerca de cento e vinte dias, os níveis de HbA<sub>1c</sub> refletem os níveis médios de glucose dos últimos dois a três meses. <sup>3</sup>

Os níveis de HbA<sub>1c</sub> encontram-se aumentados na presença de diabetes mellitus e de esplenectomia. Pelo contrário, verifica-se a sua diminuição em situações que afetem a semivida dos eritrócitos como na anemia hemolítica, esferocitose congénita e anemia falciforme. <sup>8</sup>

A amostra utilizada na medição da HbA<sub>1c</sub> é uma amostra de sangue total em EDTA. Esta deve estar previamente hemolisada antes do início da determinação.

Os princípios analíticos de quantificação da hemoglobina glicada são baseados na separação de cargas, incluindo a troca iónica (HPLC), eletroforese capilar (CE) ou diferenças estruturais entre as formas glicadas e não glicadas da hemoglobina, como no método de HPLC de afinidade ao boronato. <sup>15</sup>

Os dois equipamentos utilizados no doseamento da hemoglobina glicada, na secção de hematologia, são o Premier Hb 9210<sup>TM</sup> e o Adams HA 8160 HbA<sub>1c</sub>.

### **Hb 9210<sup>TM</sup> Premier**

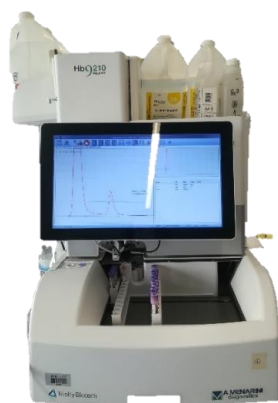
O princípio do método consiste na ligação dos grupos cis-diol da porção cetoamina das hemoglobinas glicadas ao ácido borónico. As hemoglobinas não glicadas, como as hemoglobinas A, F, S ou C, não se ligam e são eluídas pelo tampão da coluna. As hemoglobinas glicadas são eluídas pela adição de sorbitol ao tampão ou por diminuição do pH do mesmo. As duas frações são quantificadas por espectrofotometria. <sup>16</sup>

Este método não depende da temperatura e não é afetado pelas hemoglobinas F, S ou C. <sup>3</sup>

Este equipamento é composto por uma coluna analítica contendo ácido aminofenilborónico ligado a um suporte de polímero poroso. É através desta coluna que são transferidos os reagentes e amostras em análise. As amostras hemolisadas são injetadas automaticamente na coluna, onde os componentes glicados se irão ligar ao

boronato enquanto os componentes não glicosados são encaminhados para o detetor espectrofotométrico. Por fim, é adicionado um tampão cuja função é deslocar os componentes glicosados presentes na coluna, seguindo-se a leitura espectrofotométrica. <sup>17</sup>

O controlo da qualidade interna é realizado através de duas calibrações e dois controlos diários, no início do dia e a meio do fluxo de trabalho. Para além disso, este procedimento é efetuado a cada mudança de coluna ou sempre que o mesmo se justifique. Após a calibração e passagem do controlo, os resultados são visualizados num gráfico de Levey-Jennings, onde é possível detetar erros analíticos.



**Figura 8.** Hb 9210™ Premier.

(Fonte: Autoria da Própria)

### **Adams HA 8160 HbA<sub>1c</sub>**

O equipamento Adams HA 8160 HbA<sub>1c</sub> da Menarini é um analisador automático que utiliza cromatografia de troca catiónica de fase reversa em conjunto com um método colorimétrico de deteção, medindo a um comprimento de onda de 415 a 500 nm. <sup>18</sup>

Este analisador separa amostras de sangue total nas várias frações hemoglobínicas, em HbF, HbA<sub>2</sub>, HbA<sub>1c</sub>, HbS e HbC.

A amostra de sangue total em EDTA é automaticamente hemolisada por este analisador. Os resultados obtidos são apresentados em percentagem de HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1</sub> e HbF que são calculadas através dos picos das diferentes frações como percentagem de hemoglobina total. <sup>18</sup>

A determinação da HbA<sub>1c</sub> tem por base diferenças de carga iónica, a hemoglobina não-glicosada apresenta carga positiva quando comparada com a hemoglobina glicosada. <sup>19</sup>



**Figura 9.** Adams HÁ 8160 HbA<sub>1c</sub>.

(Fonte: Autoria da Própria)

## **Doseamento da Hemoglobina S**

A anemia das células falciformes consiste numa anemia hemolítica crónica, classificada morfológicamente como normocítica e normocrómica. Os eritrócitos apresentam uma forma longa e encurvada tal como uma “foice”, característica da patologia. <sup>4</sup>

A alteração da forma eritrocitária é inicialmente reversível, mas, durante as sucessivas fases de oxigenação/desoxigenação que ocorrem na circulação, a célula adquire irreversivelmente uma forma alongada ou de foice, com maior rigidez e alterações secundárias da membrana celular. <sup>20</sup>

O doseamento da hemoglobina S é efetuado por HPLC e eletroforese de hemoglobinas. A eletroforese de hemoglobinas consiste na separação e identificação de tipos normais e anómalos de hemoglobina baseada nas suas taxas de migração através da agarose ou gel de poliacrilamida num campo elétrico. A taxa de migração depende da carga. <sup>4</sup> Este método é considerado um método de referência que permite possíveis contaminações entre os picos HbA<sub>2</sub> e HbS.

Se no teste de HPLC se verificar a existência de um pico na zona de retenção da HbS procede-se à realização do teste de falciformação.

### **Teste de Falciformação**

Os testes de deteção da presença de hemoglobina S dependem do decréscimo da solubilidade desta hemoglobina a baixas tensões de oxigénio. O fenómeno de falciformação pode ser demonstrado numa lâmina de sangue selada com verniz das unhas. Se estiver presente hemoglobina S, os eritrócitos perdem a sua forma normal adquirindo uma forma alongada. <sup>10</sup>

As mudanças na forma da célula vermelha são observadas após a adição de um agente redutor como o ditionito de sódio. No procedimento são utilizados dois reagentes, o ditionito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) e o fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

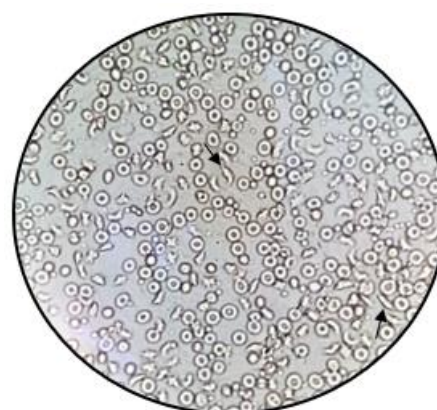
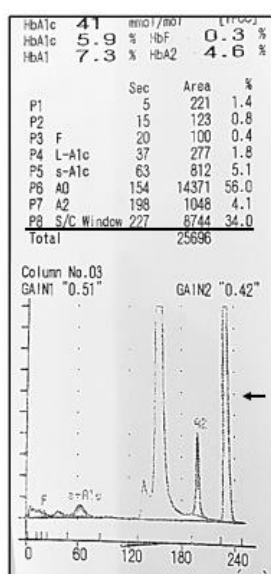
É preparada uma solução de trabalho juntando dois volumes de ditionito de sódio e três volumes de fosfato dissódico, sendo esta solução o agente redutor. De seguida, a cinco gotas da solução previamente preparada é adicionada uma gota de sangue total. É colocada uma gota numa lâmina e coberta por uma lâmina selada por verniz das unhas de modo a assegurar anaerobiose. Segue-se uma incubação a 37°C durante sessenta minutos, sendo depois observado o resultado ao microscópio.

De seguida, são apresentados alguns casos clínicos em que foi avaliada a presença de drepanocitose.

### Caso Clínico A

O resultado de HPLC apresentado pertence a um Homem de 49 anos. É possível observar um pico na zona de retenção da HbS/HbC de 34.0 %. De modo a esclarecer o resultado obtido, procedeu-se à realização da eletroforese de hemoglobinas e do teste de falciformação. Os resultados da eletroforese foram HbA= 62.3%, HbS= 34.3% e HbA<sub>2</sub>= 3.4%. O teste de falciformação deu positivo como é possível observar na imagem de microscopia.

Conclui-se que o doente apresenta um traço drepanocítico compatível com heterozigotia Hb AS.



**Figura 10.2.** Resultado do Teste de Falciformação Positivo. Observa-se a deformação dos eritrócitos (→).

(Fonte: Autoria da Própria)

**Figura 10.1.** Resultado de HPLC obtido no equipamento Adams HA 8160 HbA<sub>1c</sub>. Verifica-se a presença de um pico na zona de retenção da HbS/HbC de 34%.

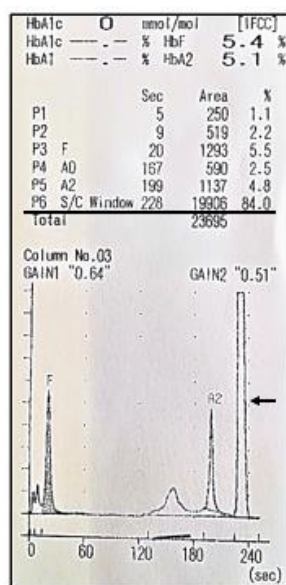
(Fonte: SYNLAB)

**Caso Clínico B**

O resultado de HPLC apresentado é pertencente a um Homem de 25 anos de idade. Verifica-se a presença de um pico na zona de retenção da HbS/HbC de 84.0 %. Como a percentagem anteriormente referida é bastante elevada, é de extrema importância executar uma eletroforese de proteínas e um teste de falciformação de modo a aferir se se trata de um caso de homozigotia Hb SS ou se o pico se deve à presença de hemoglobina C.

A eletroforese de hemoglobinas obteve os seguintes resultados: HbA= 0%, HbF=6,9%, HbS= 89,4% , HbA<sub>2</sub>= 3,7% . Através destes resultados é possível concluir que se trata de um caso de homozigotia Hb SS devido à percentagem de HbS superior a 80% e ausência de HbA, comum nestes casos. <sup>4</sup>

O teste de falciformação deu positivo com observação da deformação eritrocitária.



**Figura 11.** Resultado de HPLC obtido pelo equipamento Adams HÁ 8160 HbA<sub>1C</sub>. Verifica-se a presença de um pico na zona de retenção da HbS/HbC de 84%.

(Fonte: SYNLAB)

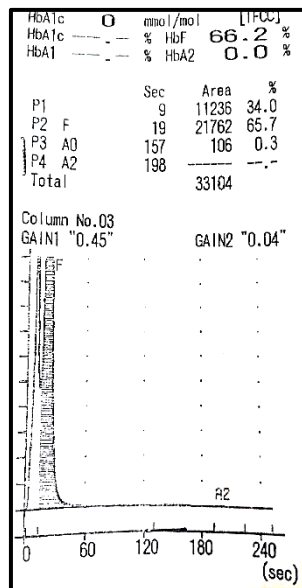
**Caso Clínico C**

O resultado de HPLC apresentado pertence a menina com 2 dias de idade. Esta recém-nascida é filha de mãe portadora de drepanocitose, sendo esse o motivo pelo qual foi testada para a presença de hemoglobina S. É possível observar a presença de um pico de 65,7 % de HbF, sendo a hemoglobina F a hemoglobina dominante em recém-nascidos. Para além disso, a HbA apresenta um pico de 0,3% e a HbA<sub>2</sub> encontra-se ausente.

Procedeu-se à realização de eletroforese de hemoglobinas, método de referência, tendo-se observado uma banda com migração na zona HbS. Os resultados obtidos foram HbA= 0%, HbF= 90,7% e HbS=9,3%.

O teste de falciformação obteve um resultado positivo com observação de deformação eritrocitária.

Como se trata de um recém-nascido, provavelmente, a deteção de HbS deve-se à presença de hemoglobina S materna. Por isso, a confirmação da patologia deve ser realizada passados um a dois meses caso a clínica assim o justifique.



**Figura 12.** Resultado de HPLC obtido através do equipamento Adams HÁ 8160 HbA<sub>1C</sub>. Observa-se a presença de um pico na zona de retenção da HbF de 65,7%, da HbA de 0,3% e ausência de HbA<sub>2</sub>.

(Fonte: SYNLAB)

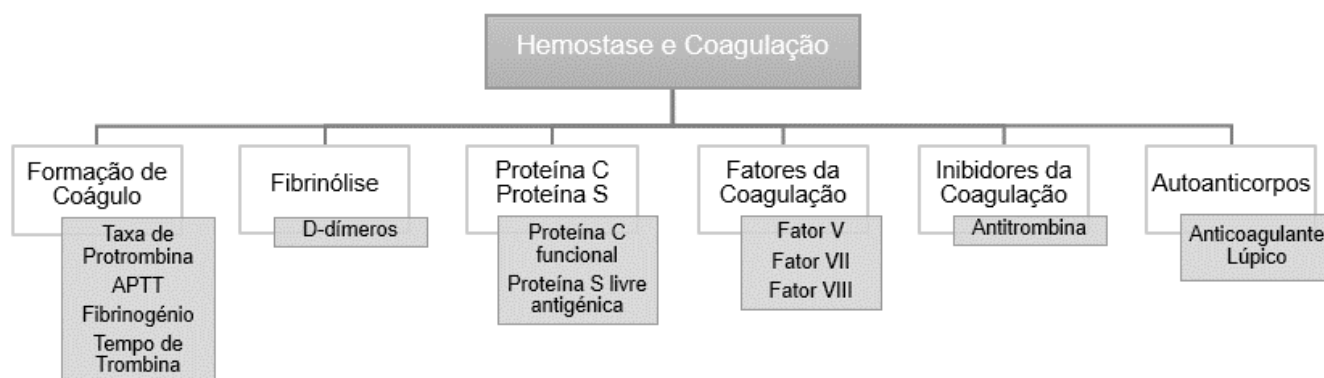
## Hemostase e Coagulação

A Hemostase consiste num processo fisiológico complexo que mantém o sangue circulante no seu estado fluido e, quando ocorre o dano, produz um coágulo de modo a parar a hemorragia, esse coágulo é formado no local onde ocorreu o ferimento acabando por dissolver o mesmo quando a ferida sara. <sup>4</sup>

Este processo de defesa do organismo envolve a interação da vasoconstrição, adesão plaquetária, agregação e ativação das enzimas da coagulação para sessar a hemorragia. <sup>4</sup>

A Hemostase divide-se em duas fases distintas, a Hemostase Primária e a Hemostase Secundária. A primeira etapa é referente ao papel dos vasos sanguíneos e plaquetas em resposta à lesão vascular, ou à descamação das células endoteliais. Na segunda etapa ocorre a ativação das proteínas plasmáticas da coagulação com o objetivo de formar um coágulo de fibrina. <sup>4</sup>

No entanto, este mecanismo de defesa do organismo contra perdas sanguíneas pode encontrar-se desequilibrado o que conduz a alterações da coagulação. Desses transtornos coagulativos podem resultar patologias como a Hemofilia, a Doença de von Willebrand e o Síndrome de Bernard-Soulier. Por esse motivo, a secção de hematologia tem um papel primordial na deteção destas doenças.



**Figura 13.** Parâmetros da hemostase e coagulação analisados na secção de Hematologia. Estes testes estão divididos com base nos princípios analíticos utilizados.

### **BCS® XP Siemens**

O BCS® XP da marca Siemens é um equipamento automatizado que permite avaliar a Hemostase a nível laboratorial. Possui a capacidade de realizar testes de coagulação cromogénicos, imunológicos e de aglutinação.

Os ensaios cromogénicos ou colorimétricos baseiam-se na utilização de um substrato oligopeptídico sintético conjugado com um cromóforo. Esta análise permite medir a atividade específica do fator de coagulação explorando as propriedades enzimáticas do mesmo. Este tipo de método é bastante vantajoso para avaliar amostras cujos pacientes possuem em circulação inibidores ou que se encontram em tratamento com anticoagulantes, devido ao facto de os inibidores não interferirem com o ensaio colorimétrico. <sup>4</sup>

Os testes imunológicos assentam na reação antigénio-anticorpo. São utilizadas micropartículas de latex que irão aglutinar com anticorpos contra o analito selecionado, desempenhando o papel de antigénio. Uma luz monocromática passa através da suspensão, e quando o comprimento de onda é superior ao diâmetro das partículas é absorvida uma pequena quantidade de luz. À medida que o diâmetro dos aglutinados, resultantes da reação antigénio-anticorpo, aumenta relação ao comprimento de onda, a luz é absorvida e o incremento da absorção é proporcional ao tamanho dos aglutinados o que se relaciona com o nível de antigénio. Este tipo de ensaio é utilizado na avaliação de D-Dímeros. <sup>4</sup>



**Figura 14.** Sistema BCS XP utilizado na testagem da hemostase.

(Fonte: Siemens Healthineers – BCS XP System)

Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/hemostasis/systems/bcs-xp-system> ; Acesso em Junho, 2021

No início de cada dia de trabalho, deve ser realizado um controlo de qualidade interna ao equipamento, de modo a obter resultados que se encontrem dentro do intervalo de valores estipulado para cada um dos parâmetros analisados. Para além disso, deve ser também realizada uma calibração do aparelho a cada mudança de lote dos reagentes, quando os resultados obtidos para os controlos não dão de acordo com o esperado ou a cada oito horas de trabalho.

O laboratório define dois intervalos de valores para os controlos: um intervalo de valores normais e outro intervalo cujos valores são patológicos.

O plasma de controlo normal é obtido de um conjunto de plasmas de doadores selecionados e saudáveis. É um controlo utilizado na avaliação da precisão e desvio analítico do tempo de tromboplastina (PTT), tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT), fibrinogénio, entre outros.<sup>21</sup>

O plasma de controlo patológico, em semelhança ao controlo normal, é obtido de um conjunto de plasmas de doadores selecionados e saudáveis, contudo este plasma é ajustado a uma concentração definida de fatores de coagulação. Pode ser utilizado na análise do tempo de tromboplastina (PTT), tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT), fibrinogénio, proteína C, proteína S, etc.<sup>22</sup>

Após a realização da calibração pelo BCS® XP, são analisados os resultados obtidos para os vários parâmetros. Se o resultado obtido apresentar um valor de desvio-padrão inferior a 20%, os controlos são validados e o equipamento está apto a realizar a análise de amostras. Se tal não acontecer e, pelo contrário, apresentar um desvio-padrão superior a 20% deve repetir-se a calibração do equipamento.

## **Testes baseados na formação de coágulo**

### **Taxa de Protrombina**

A Taxa de Protrombina (PT) é um teste utilizado para medir a atividade dos fatores I (fibrinogénio), II (protrombina), V, VII e X que participam nas vias extrínseca e comum da coagulação. Ao plasma do doente são adicionados tromboplastina e cálcio, sendo gravado o tempo de coagulação.<sup>4</sup>

O reagente utilizado para o teste é constituído por tromboplastina que, quando misturado com a amostra de plasma citratado, desencadeia a polimerização da fibrina através da ativação do fator plasmático VII. O cálcio e os fosfolípidos participam na

formação do complexo fator tecidual- fator VIIa, complexo fator VIIIa – fator IXa, e complexo fator Va – fator Xa. <sup>4</sup>

Existe uma considerável variabilidade nos resultados obtidos utilizando diferentes tromboplastinas, sendo necessária uma standardização que permita comparar resultados e uma correta interpretação do defeito hemostático ou da eficácia da terapêutica. <sup>20</sup> Para esse fim, é utilizado o INR (*International Normalized Ratio*).

$$INR = \left( \frac{PT \text{ paciente}}{PT \text{ normal}} \right)^{ISI}$$

**Equação 1.** International Normalized Ratio (INR).

Na fórmula apresentada, o PT do paciente é a Taxa de Protrombina do próprio indivíduo, enquanto o PT normal corresponde à média dos valores obtidos com plasmas de adultos saudáveis.

A razão entre os dois tempos de protrombina é corrigida pelo ISI (*International Sensitivity Index*), que compara o reagente utilizado no teste à preparação internacional de tromboplastina de referência fornecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Este índice pode ser influenciado por condições locais e específicas do laboratório, assim como pelo aparelho utilizado. <sup>4,23</sup>

A Taxa de Protrombina é realizada quando existe suspeita de coagulopatia. Algumas patologias podem prolongar o tempo de protrombina devido ao seu impacto na atividade do fator VII, como por exemplo, a coagulação intravascular disseminada, doença hepática e deficiência em vitamina K. A PT encontra-se prolongada em deficiências congênitas de alguns fatores como os fatores X, VII e V, em deficiências de protrombina ou em deficiências do fibrinogênio. <sup>4</sup>

Os resultados obtidos para o ensaio em questão podem ser afetados por diversos fatores, comprometendo a validade dos valores de PT. Alguns desses fatores são a presença de coágulo na amostra, hemólise, terapia com heparina, entre outros. É de extrema importância mitigar esses fatores de modo a assegurar um resultado fiável.

### **Tempo Parcial de Tromboplastina Ativado**

O Tempo Parcial de Tromboplastina Ativado (APTT) é um teste de monitorização da coagulação intrínseca que se encontra prolongado nas deficiências de F-XII, F-XI, F-IX, F-VIII, F-X, F-V, F-II, fibrinogénio, pré-caliceína e cininogénio de alto peso molecular (HMWK).<sup>20</sup>

Ao plasma do paciente são adicionados cloreto de cálcio, fosfolípidos e um ativador. O intervalo que decorre entre a adição do reagente à formação do coágulo é medido. O APTT é utilizado para monitorizar a terapia com heparina, deficiências na via intrínseca e o anticoagulante lúpico.<sup>4</sup>

No teste do APTT é utilizado um reagente composto por fosfolípidos e partículas ativadoras carregadas negativamente em suspensão. O ativador fornece uma superfície que medeia uma mudança conformacional no fator XII, ativando-o. O F-XIIa forma um complexo com os fatores de Fitzgerald e de Fletcher, iniciando a formação do coágulo através da via intrínseca in vitro. É ativado o F-XI que, por sua vez, ativa o fator IX.<sup>4</sup>

O fator IXa liga-se ao cálcio, fosfolípidos e fator VIIIa formando um complexo. Este complexo catalisa o fator X que, em conjunto com o cálcio, fosfolípidos e fator Va catalisam a conversão de protrombina em trombina. Esta polimeriza o fibrinogénio e a formação do coágulo de fibrina, que corresponde ao ponto final do APTT.<sup>4</sup>

### **Fibrinogénio**

O fibrinogénio é uma glicoproteína produzida no fígado constituindo-se como substrato primário da trombina, que converte o fibrinogénio solúvel em fibrina insolúvel de modo a produzir um coágulo. É uma proteína reativa de fase aguda, cujo nível aumenta em situações de inflamação, infeção e outras situações de stress.<sup>4</sup>

É classificado como o fator I na cascata da coagulação encontrando-se presente nas plaquetas, nomeadamente nos grânulos  $\alpha$ . É uma das principais proteínas envolvidas na adesão plaquetária, conjuntamente com o Fator de Von Willebrand (FvW).<sup>24</sup>

O método de determinação do nível funcional de fibrinogénio tem por base o método de Clauss. Este baseia-se na determinação do tempo de formação do coágulo após a adição de trombina ao plasma.<sup>24</sup>

O plasma a ser testado é diluído. Existe uma relação inversa entre o intervalo de formação do coágulo e a concentração funcional de fibrinogénio. Devido ao facto do

reagente de trombina se encontrar concentrado e o plasma diluído, a relação é linear quando a concentração de fibrinogénio está entre os 100 e os 400 mg/dL. Para além disso, a diluição realizada permite minimizar os efeitos antitrombóticos da heparina, dos produtos de degradação da fibrina e de paraproteínas. O intervalo de formação do coágulo é comparado com os resultados dos calibradores do fibrinogénio. <sup>4</sup>

### **Tempo de Trombina**

A trombina é a protease serina primária da coagulação, sendo produzida pela clivagem da protrombina através da ação combinativa dos fatores Xa e Va. Esta potencia a coagulação pela ativação das plaquetas, fatores XI, VII, V e XII, ativando igualmente a proteína C. <sup>4</sup>

O Tempo de Trombina (TT) consiste na medição do intervalo de formação do coágulo após a adição de trombina ao plasma. O reagente utilizado no teste em questão, promove a clivagem dos fibrinopeptídeos A e B do fibrinogénio de modo a formar um polímero de fibrina detetável. <sup>4</sup>

O TT encontra-se prolongado quando o nível de fibrinogénio se encontra abaixo das 100 mg/dL, ou seja, em casos hipofibrinogenemia. Pode prolongar-se devido à presença produtos de degradação da fibrina (FDP), paraproteínas ou heparina.

## **Testes Baseados na Análise da Fibrinólise**

### **D-dímeros**

A fibrinólise consiste no processo de digestão da fibrina por ligação à plasmina ativada através da ligação ao ativador do plasminogénio. Constitui-se como um mecanismo de remoção dos coágulos de fibrina. <sup>4</sup>

Os FDP são fragmentos proteicos que resultam da ação proteolítica da plasmina sob a fibrina. Um desses produtos são os D-dímeros. <sup>25</sup>

A medição dos D-dímeros realiza-se através de partículas de microlatex, em solução salina, revestidas com anticorpos monoclonais anti-D-dímeros. Em contato com o analito presente no plasma do utente, ocorre uma reação de aglutinação entre o anticorpo e o antigénio. Dessa aglutinação resulta uma turvação que é medida. <sup>4</sup>

A deteção deste analito é bastante importante na monitorização da fibrinólise ativa, o que implica a ocorrência de trombose. Para além disso, é essencial na exclusão de

doença tromboembólica venosa e na detecção e monitorização da Coagulação Intravascular Disseminada (DIC). Contudo, e devido à elevada sensibilidade, mas baixa especificidade, este ensaio é somente utilizado para excluir a presença de doença tromboembólica venosa. <sup>4</sup>

### **Sistema Proteína C-Proteína S**

A proteína C (PC), uma proteína dependente da vitamina K, quando ativada é uma enzima com função inibidora. Esta é ativada pela trombina quando se liga à trombomodulina. A proteína C ativada inativa os fatores Va e VIIIa de modo a diminuir a taxa de formação de trombina. <sup>2</sup>

A proteína S (PS), igualmente dependente da vitamina K, não é uma enzima, mas sim um cofator na membrana celular para a Proteína C ativada. Isto permite com que a proteína C se ligue à superfície celular de forma a inativar os fatores Va e VIIIa. <sup>2</sup>

A importância do sistema PC-PS é evidente em síndromes de púrpura fulminante em recém-nascidos com uma deficiência homozigótica de PC ou PS. Uma deficiência adquirida de Proteína C é associada a deficiência de vitamina K, incluindo terapia com antagonistas da mesma. Uma baixa concentração plasmática é também encontrada em casos de DIC, sepsis, doença hepática, drepanocitose, entre outros. <sup>10</sup>

Baixos níveis plasmáticos de Proteína S podem ser observados durante a gravidez, em casos de síndrome nefrótico, lúpus eritematoso sistémico, infeção por HIV, e na toma de anticoagulantes orais. <sup>10</sup>

### **Proteína C Funcional**

Na avaliação da Proteína C funcional existem dois tipos de métodos que podem ser utilizados: métodos cromogénicos e métodos baseados na formação de coágulo através da atividade da Proteína C.

O ensaio cromogénico consiste na mistura do plasma do utente com veneno de serpente *Agkistrodon contortix*, cujo papel é ativar a Proteína C. Após isso, é adicionado um substrato cromogénico específico da Proteína C ativada (APC). Ocorre a hidrólise do substrato por ação da APC produzindo para-nitroanilina (pNA), um produto de cor amarela. A intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à atividade da Proteína C. <sup>4</sup>

O método baseado na formação de coágulo tem como princípio a capacidade da APC de prolongar o APTT. O plasma é misturado com outro plasma pobre em Proteína C, de modo a assegurar níveis normais de todos os fatores exceto o da própria proteína. É adicionado o reagente utilizado no APTT juntamente com o veneno de serpente *Agkistrodon contortix* e com um neutralizador da heparina, assim como com cloreto de cálcio, sendo medido o tempo de formação do coágulo. O prolongamento da formação do coágulo é proporcional à atividade da Proteína C. <sup>4</sup>

### **Proteína S livre antigénica**

Ao contrário do que acontece na medição da Proteína C funcional, na avaliação da Proteína S livre antigénica não existem métodos cromogénicos. O método utilizado tem por base a formação de coágulo. O plasma do utente é misturado com um plasma pobre em Proteína S, assegurando níveis normais de todos os outros fatores. À solução tampão contendo um neutralizador da heparina, são adicionados APC e veneno de víbora Russel, seguindo-se a adição de cloreto de cálcio. Quanto mais prolongado for o resultado do teste, maior é a atividade da proteína S. <sup>4</sup>

## **Avaliação dos Fatores da Coagulação**

O APTT e o PT são a base dos ensaios de deteção de fatores da coagulação. Os testes para a deteção do fator VIII baseiam-se no APTT. Para os fatores V e VII, o ensaio baseia-se no PT. Estes métodos de avaliação dos fatores consistem na capacidade do plasma do utente de corrigir o APTT ou o PT de um plasma deficiente num fator específico. <sup>8</sup>

### **Fator V**

O fator V atua como cofator na ativação da protrombina pelo F-Xa e é ativado pela APC, ao nível do seu constituinte arginina na posição 506 (Arg506). Mutações genéticas ao nível da Arg506, conhecidas como mutação F-V Leiden, dão origem a uma trombofilia familiar importante, devida à resistência à APC. <sup>20</sup>

A avaliação do fator V é realizada através da mistura do plasma do utente com um plasma deficiente em F-V assim como com o reagente utilizado no PT. <sup>4</sup> Após a adição de tromboplastina, e consequente ativação da via extrínseca da coagulação, é medido o tempo que decorre até à formação do coágulo.

A sensibilidade e especificidade destes testes varia com a presença da mutação F-V Leiden, o que é melhorado através da adição de plasma com deficiência em Fator V.

Isto reduz o efeito de outros fatores com o Fator VIII e protrombina, recuperando a sensibilidade em doentes que tomam anticoagulantes orais. <sup>10</sup>

### **Fator VII**

O Fator VII, dependente de vitamina K, é sintetizado primariamente no fígado. A função do F-VII ativado é de inibidor da via extrínseca da coagulação quando ligado a fator tecidual, um cofator de membrana. <sup>25</sup>

A deficiência em Fator VII é um distúrbio autossômico recessivo com um fenótipo bastante variado assim como com genótipo variável. <sup>25</sup>

Um plasma deficiente em qualquer um dos fatores pertencentes à via extrínseca irá originar um PT prolongado. Em semelhança ao descrito para a determinação do Fator V da coagulação, para verificar a deficiência em Fator VII, deve ser utilizado um plasma pobre no fator em questão de modo a identificar essa carência. Esse plasma é adicionado ao plasma do doente, sendo utilizado o reagente do PT.

Se o plasma do doente apresentar uma deficiência de Fator VII, não será capaz de compensar a falta de fator no plasma com deficiência do fator de coagulação em estudo, levando ao aumento do Tempo de Protrombina. <sup>26</sup>

### **Fator VIII**

O Fator VIII é um cofator procoagulante. Este fator na sua forma livre plasmática é instável, circulando ligado ao FvW. A sua avaliação é realizada quando o APTT se encontra prolongado e o PT e TT normais, e quando não existe uma explicação para esse prolongamento tal como terapia com heparina ou anticoagulante lúpico. <sup>4</sup>

No ensaio de fatores baseado no APTT, é utilizado um plasma deficiente em fator VIII. Este plasma fornece uma atividade normal de todos os procoagulantes exceto do F-VIII. Quando testado sozinho, o plasma com deficiência em fator VIII prolonga o APTT, mas quando adicionado um plasma normal, o Tempo Parcial de Tromboplastina Ativado retorna a valores normais. Quando existe uma deficiência no fator em questão, a adição do plasma do doente ao plasma deficiente em F-VIII faz com que o APTT continue prolongado. O resultado obtido é comparado com uma curva de referência preparada pelo próprio laboratório, de modo a estimar o nível de atividade do F-VIII. <sup>4</sup>

## **Inibidores da Coagulação**

### **Antitrombina**

A Antitrombina (AT) é uma protease serina inibidora que protege contra a formação de trombos pela inibição da trombina, incluindo os fatores IXa, Xa e XIa. <sup>8</sup>

A AT pode apresentar-se afetada pelas mais diversas patologias das quais a doença hepática, síndrome nefrótica, DIC, assim como pela terapia prolongada com heparina, asparaginase e contraceptivos orais. A deficiência em AT pode ser classificada em tipo I quando existe uma redução da produção, e em tipo II quando não existe uma redução na produção, mas as moléculas são não funcionais. <sup>4</sup>

A determinação da atividade da AT pode ser realizada através de métodos baseados na formação de coágulo ou métodos cromogénicos. O plasma do doente é misturado com uma solução de heparina e fator Xa, e incubado a 37°C durante alguns minutos. Durante a incubação, a antitrombina plasmática ativada por heparina liga-se, de forma irreversível, ao fator Xa. O F-Xa residual hidrolisa um substrato cromogénico, adicionado como segundo reagente. O grau de hidrólise, medido pela intensidade da cor do produto final, é inversamente proporcional à atividade da antitrombina no plasma. <sup>4</sup>

### **Anticoagulante Lúpico**

O Anticoagulante Lúpico (AL) é um autoanticorpo para ligação fosfolípídica de proteínas como a  $\beta$ 2-glicoproteína I, anexina e protrombina. Está presente como uma condição primária ou secundária a um distúrbio do colagénio, tal como o Lúpus Eritematoso Sistémico, Síndrome de Sjögren ou Artrite Reumatoide. O AL crónico está relacionado com doenças venosas e arteriais, trombose e aborto espontâneo. <sup>4</sup>

Para deteção do AL são utilizados métodos baseados na formação de coágulo com um reagente com uma concentração reduzida de fosfolípidos. Os dois métodos mais utilizados são o Tempo de Veneno de Víbora de Russel (DRVVT) e o APTT, ambos formulados com baixas concentrações de fosfolípidos de modo a serem sensíveis ao AL. <sup>4</sup>

O veneno de víbora Russel (VVR) ativa o Fator X levando à formação de um coágulo de fibrina na presença de Fator V, protrombina, fosfolípidos e iões de cálcio. O AL prolonga o tempo de coagulação através da ligação aos fosfolípidos prevenindo a ação do VVR. <sup>10</sup>

O método do DRVVT consiste na utilização de dois tipos de reagentes: um reagente de rastreio LA 1, que consiste num reagente simplificado de veneno de víbora Russel diluído (DRVV), e um reagente de confirmação LA 2, rico em fosfolípidos para correção do AL. <sup>27</sup>

No reagente LA 1 está presente o DRVV que inicia a coagulação através da ativação do fator X. Os anticorpos LA prolongam o tempo de coagulação do reagente. O LA 2 contém uma concentração de fosfolípidos superior ao LA 1, sendo que estes fosfolípidos suplementares reagem contra o anticorpo LA corrigindo o tempo de coagulação. <sup>27</sup>

De modo a excluir o défice de fatores II, V e X, é realizado uma mistura do plasma do doente com um plasma normal. Para além disso, esses fatores são corrigidos através da utilização do reagente LA 2 depois do reagente LA 1.

O resultado final é dado através da razão entre o tempo de coagulação para o LA 1 e para o LA 2.

$$Ratio AL = \frac{Tempo\ de\ coagula\c{a}\o\ do\ reagente\ de\ rastreio\ LA\ 1}{Tempo\ de\ coagula\c{a}\o\ do\ reagente\ de\ confirma\c{a}\o\ LA\ 2}$$

**Equação 2.** Fórmula de obtenção do anticoagulante lúpico (AL). O valor de AL é obtido através da razão entre o tempo de coagulação do reagente LA 1 e o reagente LA 2.

### **Caso Clínico**

No exemplo presente na tabela situada a baixo, podemos observar o resultado do teste de deteção do Anticoagulante Lúpico para três doentes.

Os valores de referência para o método em questão foram obtidos de amostras de 20 a 30 doentes saudáveis, estando o intervalo normal do reagente LA 1 compreendido entre os 31 a 44 segundos e o intervalo normal do LA 2 entre os 30 a 38 segundos. A razão LA 1: LA 2 situa-se entre os 0.8 e 1.2. <sup>27</sup>

Segundo a bula dos reagentes LA 1 e LA 2, se a razão entre ambos for superior a 2.0, a presença de AL é forte. Se se situar entre 1.5 e 2.0, a presença é moderada. Por fim, se a razão estiver entre 1.2 e 1.5, a presença de AL é fraca. <sup>27</sup>

É possível concluir que todos os doentes apresentam valores, tanto de LA 1 como de LA 2, dentro do intervalo de valores estabelecido. Todos exibem uma razão LA 1: LA 2 compreendida entre 1,2 e 1,5, o que significa que a presença de AL é fraca.

**Tabela 4.** Exemplo de resultados obtidos para a detecção de Anticoagulante Lúpico segundo o método do Tempo de Veneno de Víbora de Russel (DRVVT). Resultado obtido através de BCS® XP Siemens.

(Fonte: SYNLAB)

<b>Identificação do doente</b>	<b>LA 1 (segundos)</b>	<b>LA 2 (segundos)</b>	<b>Razão LA 1: LA 2</b>
<b>A</b>	42.3	32.1	1.32
<b>B</b>	41.3	36.5	1.13
<b>C</b>	41.3	33.0	1.25

## **Imunohematologia**

A Imunohematologia é a área que estuda os antígenos presentes nos vários componentes sanguíneos, os seus respectivos anticorpos, assim como as reações antígeno-anticorpo. Para além disso, tem um papel bastante importante na Medicina Transfusional onde permite verificar a compatibilidade entre o dador e o doente.

### **Tipagem AB0 RH**

O sistema AB0 é um dos trinta sistemas sanguíneos que se conhecem sendo aquele que apresenta um maior significado clínico devido à ocorrência de anticorpos IgM. Cada um dos sistemas é constituído por um conjunto de antígenos eritrocitários, determinados por um único locus ou por diversos loci ligados. <sup>10,24</sup>

O sistema sanguíneo referido é constituído por quatro grupos sanguíneos: A, B, AB e 0. É responsável pela biossíntese dos antígenos ABH. A esses antígenos surgem os respetivos anticorpos, durante alguns meses após o nascimento o que permite o agrupamento reverso como forma de confirmar o fenótipo dos eritrócitos. <sup>10</sup>

O sistema RH é também ele bastante importante devido ao facto de os antígenos RH, especialmente o antígeno D, serem altamente imunogénicos.<sup>24</sup>

### **Teste de Coombs**

O teste de Coombs consiste num procedimento de monitorização em que é utilizada uma globulina anti-humana (GAH) para detetar anticorpos e complemento ligados aos eritrócitos in vivo. <sup>4</sup>

Os reagentes AHG podem ser poliespecíficos ou monoespecíficos. Os reagentes poliespecíficos contêm anticorpos com atividade IgG anti-humana e anti-complemento.

Os reagentes monoespecíficos são utilizados para determinar que proteína é responsável pela positividade do teste de Coombs direto.<sup>25</sup>

O teste de Coombs direto é realizado através da lavagem das células em análise com solução salina adicionando reagente poliespecífico AHG e observando a aglutinação.<sup>25</sup>

O teste de Coombs indireto tem como objetivo determinar a presença de anticorpos eritrocitários no soro e no plasma.<sup>25</sup>

### **Swing Twinsampler e Saxo ID-Reader**

Os equipamentos Swing Twinsampler e Saxo ID-Reader, ambos da BIO-RAD®, são utilizados em conjunto para realizar a tipagem AB0 RH e testes de Coombs.

O Swing Twinsampler é um pipetador automático de cartões de identificação e microplacas. Tem capacidade para dezanove amostras, vinte e quatro cartões de identificação e doze reagentes.

O Saxo ID-Reader é um equipamento que funciona como centrifugadora e leitor dos cartões anteriormente processados no Swing Twinsampler. Tem capacidade para vinte e quatro cartões de identificação. Após a leitura, o equipamento transmite os resultados obtidos para o computador a que está conectado de forma a validar os mesmos.



**Figura 15.** Swing Twinsampler BIO-RAD®.

(Adaptado de: "Swing TwinSampler- Pipettor for ID-Cards and Microplates", 2008)

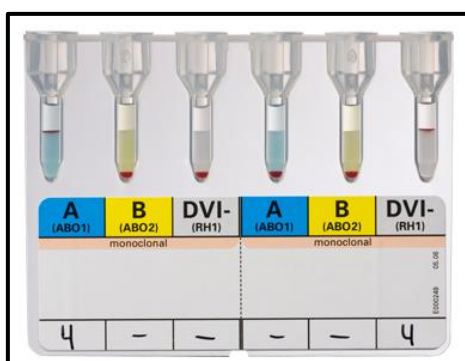


**Figura 16.** Saxo ID-Reader BIO-RAD®.

(Adaptado de: "Saxo ID-Reader – Centrifuge and Reader for ID-Cards", 2016)

São utilizados dois tipos de cartões de identificação destinados à tipagem AB0 RH e aos testes de Coombs.

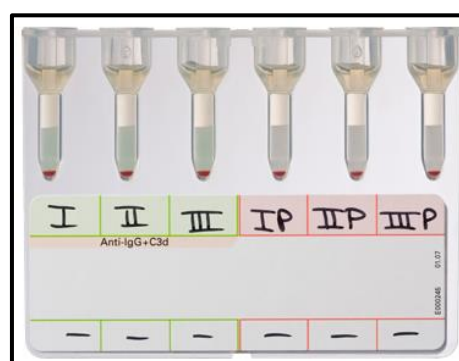
Os cartões de tipagem comportam duas amostras em simultâneo e têm para cada uma três microtubos, um com anticorpo anti-A, outro com anticorpo anti-B e, por fim, um com anticorpo anti-D que permite a identificação do grupo RH. Os cartões destinados à realização de testes de Coombs apresentam no total seis microtubos contendo anti-IgG e anti-C3d numa matriz de gel, permitindo a testagem de três amostras em simultâneo.



**Figura 17.** Cartões de confirmação ABD da BIO-RAD®.

(Fonte: DiaClon ABD-Confirmation for Patients, BIO-RAD)

Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/diaclon-abd-confirmation-for-patients?ID=L0337297Q>; Acesso em Junho, 2021



**Figura 18.** Cartões utilizados na realização de testes de Coombs da BIO-RAD®.

(Fonte: LISS/Coombs + Enzyme Test, BIO-RAD)

Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/liss-coombs-enzyme-test?ID=L02QYDIDF>; Acesso em Junho, 2021

Após a centrifugação dos cartões de identificação, os mesmos são colocados no equipamento Swing Twinsampler em conjunto com as respetivas amostras, diluente e dois controlos, para tipagem sanguínea, um negativo para o tipo A e um positivo para o tipo B. No fim da pipetagem, os cartões identificativos são transferidos para o equipamento Saxo ID-Reader, sofrendo centrifugação e posterior identificação do resultado obtido.

Os resultados da tipagem sanguínea são lidos no computador ligado ao aparelho de leitura e interpretados pelo operador, concluindo-se a que tipo de sangue pertence a amostra analisada.

Um resultado positivo para o teste de Coombs direto indica a presença de anticorpos IgG ou do complemento ligado ao eritrócito. Um resultado negativo indica a ausência de sensibilidade eritrocitária, ou seja, não existe ligação do anti-IgG ou anti-C3d. <sup>25,28</sup>

Um resultado positivo para o teste de Coombs indireto sugere que os anticorpos IgG no plasma do paciente se ligaram às células presentes no reagente. Para além disso, indica que existem anticorpos capazes de reagir contra os glóbulos vermelhos e que podem hemolisar as mesmas em caso de transfusão. <sup>25</sup>

Ambos os testes anteriormente referidos, no contexto deste laboratório, são utilizados em análises de rotina, mas, principalmente, em grávidas.

### **Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo é uma tecnologia baseada em laser, que tem a capacidade de identificar e quantificar populações celulares. As células em suspensão são manipuladas numa corrente de fluidos onde células individuais são analisadas por um sistema eletrónico de deteção. <sup>10</sup>

A grande vantagem desta técnica analítica é a sua enorme capacidade de análise rápida e simultânea de múltiplos parâmetros num grande número de células. <sup>4</sup>

A avaliação da presença ou ausência de múltiplos marcadores de superfície celular através da utilização de citometria de fluxo policromática constitui a base da imunofenotipagem. Isto permite a caracterização de populações celulares e de subpopulações, identificação do estado de diferenciação celular e quantificação de proteínas de superfície associadas a funções celulares específicas. <sup>29</sup>

Esta técnica depende da aplicação de fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais que são específicos para um determinado antigénio presente na superfície celular, citoplasma ou no núcleo. Cada um dos fluorocromos apresenta um pico de excitação e um comprimento de onda de emissão. <sup>10</sup>

A sua principal importância é no diagnóstico de patologias hematológicas malignas.

#### **Citómetro de Fluxo Navios™ Ex**

O Citómetro de Fluxo Navios™ Ex da Beckman Coulter® é um equipamento que permite a avaliação das características celulares através da aplicação de anticorpos monoclonais ligados às mesmas e conjugados a fluorocromos.

O equipamento mede a dispersão direta da luz, *Forward scatter*, que indica o tamanho da célula, e a dispersão lateral da luz, *Side scatter*, que revela a complexidade da superfície celular e das suas estruturas internas como grânulos e vacúolos. Tudo isto é

possível devido à presença de três lasers: violeta, azul e vermelho. Estes lasers excitam dez fluorocromos nos diversos comprimentos de onda, respetivamente, 405 nm, 488 nm e 638 nm. <sup>4,30</sup>

### **Amostras utilizadas em Citometria de Fluxo**

A técnica de Citometria de Fluxo pode ser executada em qualquer amostra onde as células estejam viáveis em suspensão. As amostras de sangue periférico, medula óssea e líquidos biológicos requerem que ocorra a lise prévia dos eritrócitos. <sup>10</sup> Para além disso, amostras de punção medular devem ser passadas através de uma agulha de modo a desagregar grumos medulares impedindo o entupimento do Citómetro de fluxo. Deve ser escolhido um painel de marcadores celulares adequado à informação clínica e pedido médico.

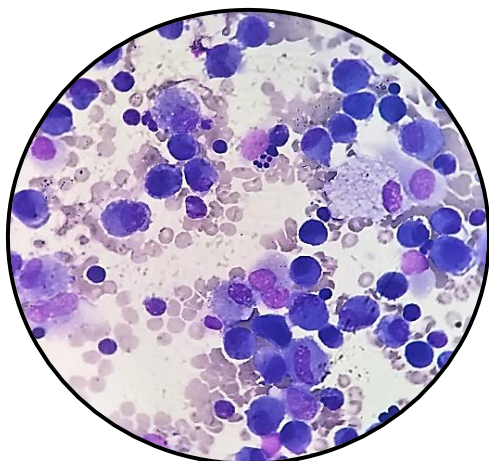
Outras amostras utilizadas são o lavado bronquioalveolar (LBA) e o líquido cefalorraquidiano (LCR). Estas amostras possuem procedimentos próprios, como por exemplo, o LCR deve ser colhido em tubo de EDTA com Transfix <sup>®</sup>, um fixador que permite conservar a membrana celular até quinze dias.

As amostras que se encontrem coaguladas ou que tenham sido colhidas há mais de 48 horas e que não tenham sido conservadas com um estabilizador, devem ser rejeitadas e pedida nova colheita.

### **Processamento de amostras**

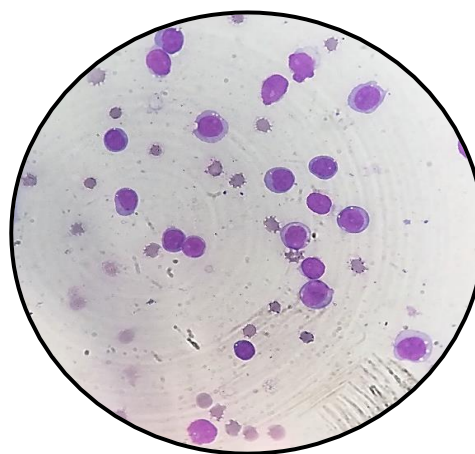
Deve ser realizada a contagem das células presentes nas diversas amostras através da utilização do contador automático, tal como UniCel <sup>®</sup> DxH 800 series da Beckman Coulter <sup>®</sup>, e executado um esfregaço das mesmas de modo a observar ao microscópio e caracterizar as células observadas. Esta caracterização morfológica é bastante importante para definir qual o painel de marcadores celulares mais adequado à amostra a processar.

Se existir suspeita de presença de doença linfoproliferativa, é realizado um estudo inicial das populações celulares, incluindo anticorpos específicos para antígenos expressos pelos linfócitos B, T e células *natural killer* (NK), tais como CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD20, CD56 e cadeias leves kappa e lambda. <sup>31</sup> Caso se verifique a existência de uma doença linfoproliferativa B ou T procede-se à realização de um teste complementar para os respetivos linfócitos.



**Figura 19.** Observação Microscópica de amostra de líquido bronquioalveolar.

(Fonte: Autoria da Própria)



**Figura 20.** Observação Microscópica de amostra de líquido pleural.

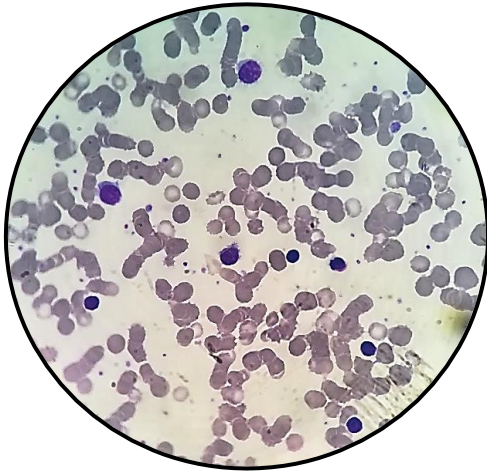
(Fonte: Autoria da Própria)

### **Avaliação Externa da Qualidade em Hematologia**

A Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) tem como principal objetivo detectar problemas de exatidão no laboratório. São fornecidas ao laboratório amostras de conteúdo desconhecido de modo que as mesmas sejam analisadas como se tratasse de amostras de doentes. Estas amostras são analisadas segundo um calendário definido pelo programa de AEQ e os resultados obtidos são comparados com o valor verdadeiro, assim como comparados com resultados de outros laboratórios participantes. Estes programas asseguram a comparabilidade dos resultados.

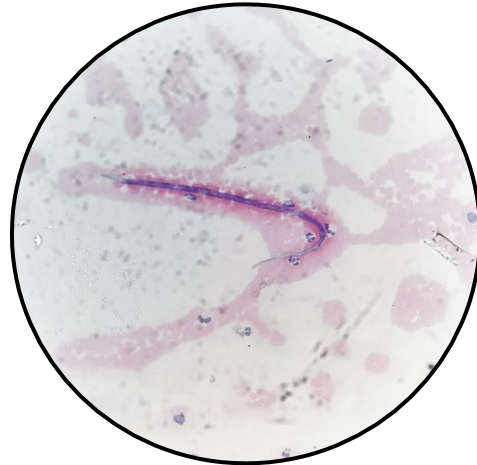
Um exemplo de programa de AEQ é o programa UK NEQAS<sup>®</sup>. É um programa internacional de avaliação da qualidade externa e tem ao dispor dos laboratórios inúmeros programas para os mais diversos parâmetros analíticos.

No laboratório de hematologia, o UK NEQAS<sup>®</sup> é utilizado na avaliação da morfologia do sangue periférico e na pesquisa de hematozoários em lâminas enviadas pelo programa. São cedidas duas lâminas para cada uma das áreas e é pedido que seja elaborado um diagnóstico e enviado para o programa até à data estipulada. Os resultados obtidos, como referido anteriormente, são comparados com os resultados de outros laboratórios para onde foram enviadas as mesmas amostras de modo a avaliar a comparabilidade dos mesmos.



**Figura 21.** Avaliação morfológica de amostra de sangue periférico do programa de avaliação externa da qualidade. Observa-se a presença de uma leucemia a *Hairy Cells*.

(Fonte: Autoria da Própria)



**Figura 22.** Avaliação morfológica de amostra de sangue periférico do programa de avaliação externa da qualidade. Observa-se a presença do hematozoário *Loa loa*.

(Fonte: Autoria da Própria)

## Imunologia

A Imunologia define-se como o estudo da resposta imunológica, incluindo a resposta a agentes patogênicos, danos tecidulares e o seu papel na doença. O conjunto de células, tecidos e moléculas que medeiam a resistência a infecções denomina-se Sistema Imunitário (SI).<sup>32</sup>

O SI tem como principal função a proteção do seu hospedeiro contra a invasão de organismos estranhos fazendo a distinção entre o “self” e o “non-self”, ou seja, entre o que é endógeno e exógeno. O seu bom funcionamento não protege apenas o hospedeiro de fatores externos ao organismo como microrganismos ou toxinas, mas previne também ataques de fatores endógenos, tal como tumores.<sup>33</sup>

No presente capítulo deste relatório serão abordadas as áreas de Autoimunidade, Imunoquímica e Serologia Manual, a sua metodologia e respetivo papel no diagnóstico e monitorização de doença.

## **Autoimunidade**

A Autoimunidade define-se como a resposta imune contra os antígenos endógenos. O processo autoimune é uma interação complexa onde são montadas respostas adaptativas contra os autoantígenos devido à perda ou evasão aos mecanismos de tolerância imunológica. São originadas doenças autoimunes resultantes da desregulação dos processos e vias imunológicas que estão envolvidas na função imune normal, provocando danos patológicos aos próprios tecidos. <sup>34</sup>

O diagnóstico das diversas doenças autoimunes é baseado na presença de autoanticorpos reativos. Os autoanticorpos ligam-se aos antígenos endógenos, como proteínas e ácidos nucleicos, danificando as células através da formação de complexos imunes. <sup>35</sup>

Os anticorpos antinucleares (ANA) são anticorpos direcionados contra vários componentes do núcleo. A detecção dos ANA e de anticorpos contra componentes citoplasmáticos apresenta um papel importante no diagnóstico de diversas doenças autoimunes tais como o Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Artrite Reumatoide, Doença Mista do Tecido Conjuntivo, entre outras. <sup>36,37</sup>

Estão atualmente disponíveis diversos ensaios imunológicos que permitem a detecção de autoanticorpos no soro, entre os quais a Imunofluorescência Indireta, ensaios enzimáticos como ELISA e o ImunoBlot.

### **Imunofluorescência Indireta**

A Imunofluorescência Indireta (IFI) baseia-se no facto dos anticorpos não reagirem apenas com antígenos homólogos, mas poderem também atuar como antígenos e reagir com anti-anticorpos. Se um anticorpo específico estiver presente numa amostra de soro, esse mesmo anticorpo ligar-se-á a um antígeno específico. É adicionada uma globulina anti-humana (GAH) conjugada a um composto fluorescente. O marcador conjugado liga-se a qualquer anticorpo ligado ao antígeno, o que permite a sua visualização ao microscópio de fluorescência. O marcador fluorescente apresenta uma coloração verde. <sup>38</sup>

O equipamento Sprinter XL da EUROIMMUN® é um equipamento automático que procede à incubação da amostra com diversos substratos e os marca com IgG anti-humana conjugada com fluoresceína isotiocianante e iodeto de propídio, de modo que

se possa avaliar a presença de autoanticorpos através de microscopia imunofluorescente automática.

O substrato a utilizar no imunoensaio referido depende dos autoanticorpos que se pretende detetar. Alguns dos substratos utilizados são as células epiteliais humanas (HEp-2), fígado de primata, substrato triplo composto por fígado, rim e estômago de rato, granulócitos, entre outros.



**Figura 23.** Equipamento automático Sprinter XL<sup>®</sup> utilizado na detecção de anticorpos antinucleares.

(Fonte: Autoria da Própria)

### **Deteção de Autoanticorpos Antinucleares**

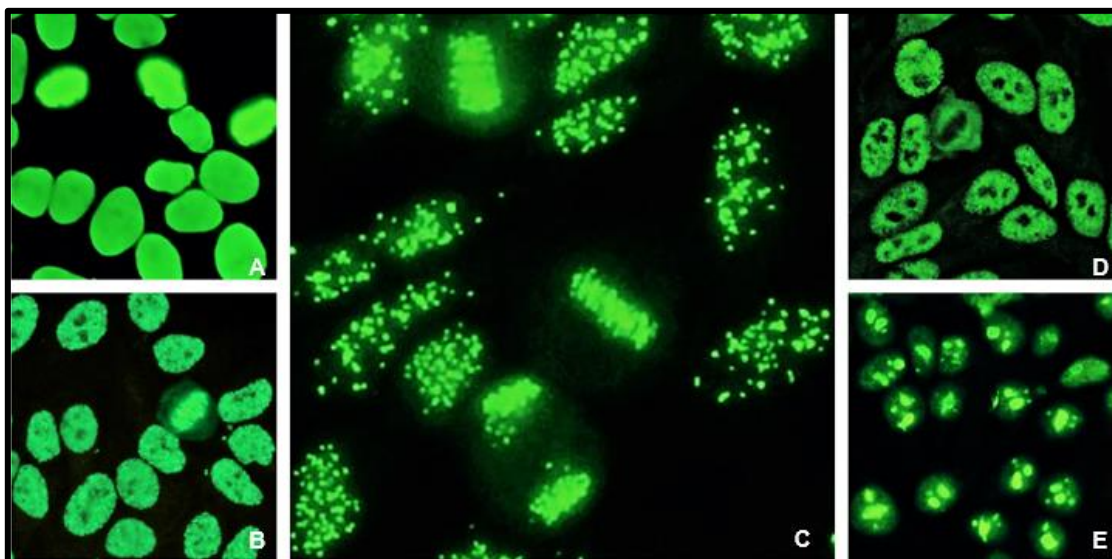
Como referido anteriormente, os ANA são uma classe de anticorpos específicos que atacam diferentes proteínas e DNA dentro do núcleo celular. A sua especificidade varia de acordo com o tipo de doença autoimune e resulta nas diferentes localizações dos anticorpos dentro do núcleo, o que explica os diferentes diagnósticos.<sup>39</sup>

O método standard utilizado na monitorização dos ANA é IFI em células HEp-2 e em células de fígado de primata. A utilização das HEp-2 permite uma elevada sensibilidade na identificação de autoanticorpos pelo seu padrão característico de fluorescência devido à presença de múltiplos autoantígenos neste substrato. A utilização de dois substratos celulares permite a comparação dos padrões de fluorescência e a pré-diferenciação de anticorpos.<sup>36,40</sup>

A deteção de ANA no soro é característica de diversas patologias, nomeadamente de doenças reumáticas. A sua prevalência é significativa no Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), Lúpus Eritematoso induzido por medicamentos, doença mista do tecido conjuntivo, Artrite Reumatoide, entre outras. O significado da sua presença no soro deve

ser considerado tendo em conta a idade do utente, género, sintomas e sinais clínicos, assim como outros parâmetros analíticos. <sup>38,41</sup>

Cada autoanticorpo ligado provoca um padrão de fluorescência específico, dependendo da localização do autoantígeno correspondente. O padrão obtido no substrato de células HEp-2 é analisado por microscopia imunofluorescente automática e avaliado por um software que identifica as células, classifica a imagem como positiva ou negativa, identificando o padrão em caso de positividade. <sup>36</sup>



**Figura 24.** Padrões nucleares de fluorescência detetados em células HEp-2 na determinação de anticorpos antinucleares (ANA) por imunofluorescência indireta (IFI). Em (A) observa-se um padrão homogêneo, em (B) um padrão fino-granular denso e em (C) um padrão característico de anticorpos anti-centrómero. As letras (D) e (E) representam os padrões mosqueado e nucleolar homogêneo, respetivamente.

(Adaptado de: "ANA diagnostics using indirect immunofluorescence", 2019)

### Deteção de Autoanticorpos Anti Citoplasma dos Neutrófilos

Os Autoanticorpos Anti Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA) são autoanticorpos direcionados contra os antígenos presentes nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos e monócitos. Os ANCA são tipicamente encontrados na Poliangeite Microscópica (MPA), no Síndrome de Churg-Strauss e na Granulomatose de Wegener, todas formas de vasculite dos pequenos vasos. <sup>37,42</sup>

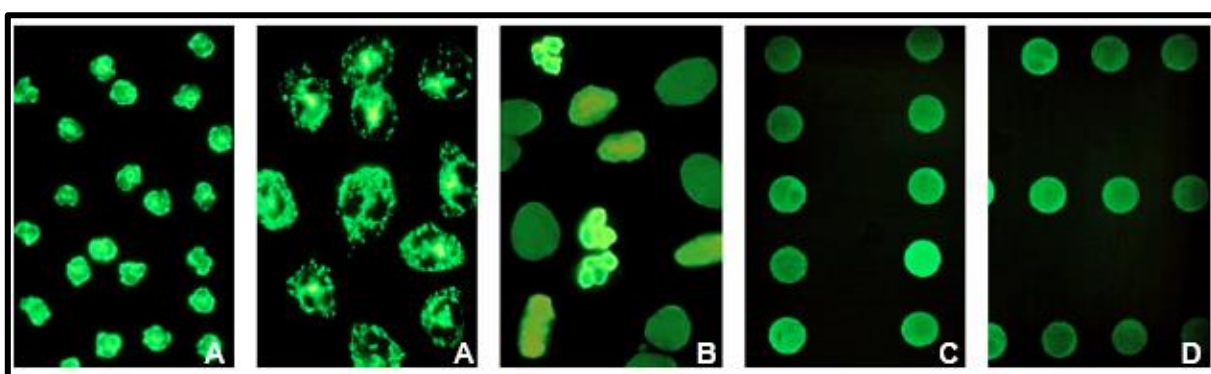
Os ANCA são classificados de acordo com os padrões produzidos através de IFI em neutrófilos normais e com os antígenos alvo. Podem subdividir-se em dois tipos: ANCA citoplasmático (c-ANCA) e ANCA perinuclear (p-ANCA). <sup>42</sup>

Para determinação destes autoanticorpos, o soro é incubado com neutrófilos fixados em etanol de modo a observar dois tipos de reatividade. Se estiver presente o c-ANCA, é

observada uma fluorescência granular distribuída de forma regular pelo citoplasma dos granulócitos, onde ocorre especificidade contra a proteinase-3 (PR3). Se, pelo contrário, estiver presente o p-ANCA, observa-se uma fluorescência lisa que envolve em forma de fita o núcleo dos granulócitos, cuja especificidade é contra a mieloperoxidase (MPO).

37,43

São utilizados diversos substratos para a observação de ANCA dos quais granulócitos humanos, substratos constituídos por antígenos PR3 e MPO altamente purificados, granulócitos humanos juntamente com células HEp-2 o que permite a diferenciação entre ANCA e ANA. <sup>43</sup>



**Figura 25.** Padrões de fluorescência obtidos na detecção de Anticorpos Anti Citoplasma de Neutrófilos (ANCA) em vários substratos por Imunofluorescência Indireta (IFI). **(A)** representa dois substratos de granulócitos humanos, em **(B)** está presente um substrato misto constituído por células HEp-2 e granulócitos o que facilita a diferenciação entre ANCA e ANA. **(C)** e **(D)** representam substratos altamente purificados dos antígenos PR3 e MPO, respetivamente.

(Adaptado de: "EUROPLUS™ "Granulocyte Mosaic 25"", 2013)

## Deteção de Doenças Hepáticas Autoimunes

### Hepatite Autoimune

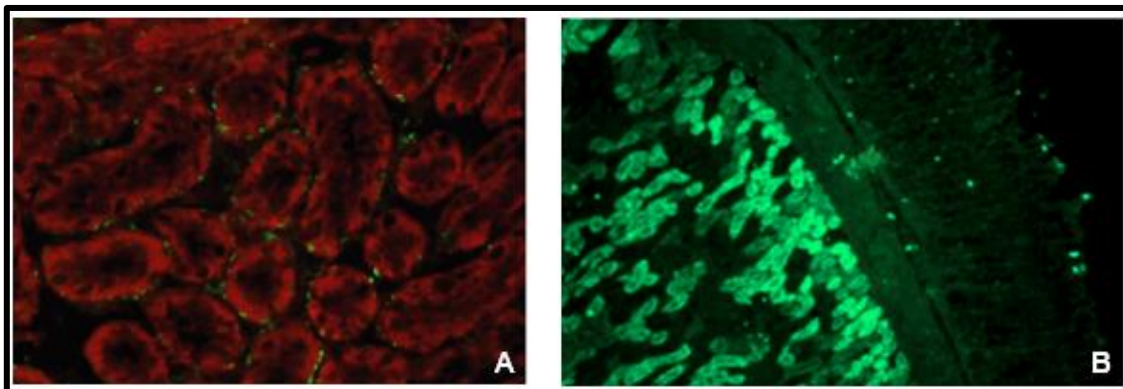
A hepatite autoimune (HAI) constitui-se como uma inflamação crónica hepática de etiologia desconhecida. O diagnóstico desta patologia assenta na determinação de autoanticorpos específicos e na exclusão da hipótese de hepatite viral. Subdivide-se em HAI-1 e HAI-2 com base no perfil de autoanticorpos observado e na idade de início, em que o subtipo 1 surge, maioritariamente, na idade adulta e o subtipo 2 em idade juvenil.

44,45

Os principais anticorpos observados na HAI-1 são os autoanticorpos anti-musculatura lisa (ASMA), os ANA e os SLA/LP. Os ASMA, cujo antígeno-alvo é a F-actina, são o principal marcador serológico da presença deste subtipo da doença. <sup>44</sup>

Na HAI do tipo 2, os principais anticorpos encontrados são o autoanticorpo anti microsomas fígado-rim (LKM-1), cujo antígeno-alvo é o citocromo P4502D6 (CXP2D6), e o autoanticorpo anti antígeno citosol hepático tipo 1 (LC-1), que tem como alvo o antígeno formiminotransferaseciclodes-aminase (FTCD).<sup>44</sup>

Os substratos utilizados para a detecção dos referidos autoanticorpos são rim, fígado, estômago de rato e também células musculares lisas vasculares (VSM47) na detecção de autoanticorpos anti F-actina.<sup>46</sup>



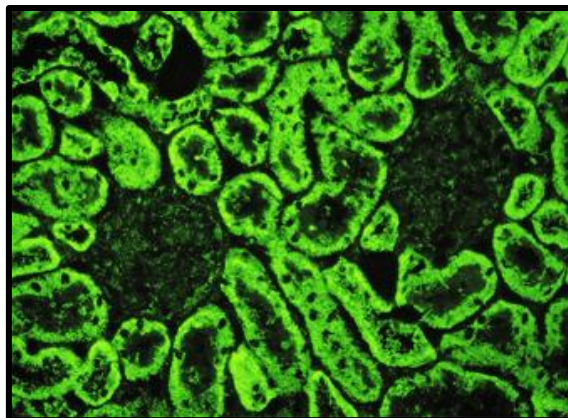
**Figura 26.** Padrões de fluorescência obtidos na detecção de Anticorpos Anti-Musculatura Lisa (ASMA) e Anticorpos Anti Microsomas Fígado-Rim (LKM-1) em vários substratos por Imunofluorescência Indireta (IFI). Em **(A)** verifica-se a presença de ASMA específicos para a F-actina, sendo possível observar fibras contráteis em redor dos túbulos renais. Em **(B)** observa-se uma coloração característica dos túbulos renais devido à ligação do anticorpo LKM-1.

(Adaptado de: "Diagnostic autoantibodies for autoimmune liver diseases", 2017)

### **Colangite Biliar Primária**

A colangite biliar primária (CBP) classifica-se como uma doença progressiva de começo insidioso que resulta na destruição das células epiteliais dos pequenos ductos biliares intra-hepáticos levando a colestase e cirrose.<sup>44</sup>

Os critérios de diagnóstico desta patologia assentam na presença de marcadores bioquímicos de colestase hepática, biópsia do fígado e a presença de autoanticorpos específicos para a doença, os Autoanticorpos Anti-Mitocôndria (AMA) cujo alvo antigénico é o componente M2. Para além disso, deve realizar-se uma determinação complementar de ANA, nomeadamente, os autoanticorpos anti pontos nucleares (Sp100 e PML) e membrana nuclear (gp210).<sup>46</sup>



**Figura 27.** Padrão de fluorescência obtido na detecção de Autoanticorpos Anti-Mitocôndria (AMA) em substrato de rim de rato por Imunofluorescência Indireta (IFI). É possível observar uma fluorescência granular no citoplasma das células tubulares distais e proximais.

(Adaptado de: "Primary biliary cholangitis", 2020)

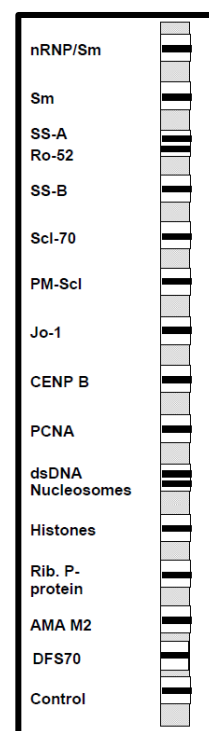
Disponível em: <https://www.euroimmun.com/products/autoimmune-diagnostics/id/hepatology/primary-biliary-cholangitis/>  
Acesso em Setembro, 2020

## Perfis de Anticorpos

### Imunoblot

A técnica de Imunoblot ou Western Blot consiste na utilização de tiras teste constituídas por um conjunto de antígenos purificados que são utilizadas como fase sólida. As amostras de soro dos utentes diluídas são incubadas juntamente com as tiras teste. Em primeiro lugar, ocorre um passo de eletroforese que permite transferir para a tira as proteínas separadas segundo o seu peso molecular. Se ocorrer uma reação positiva, verifica-se a ligação do anticorpo IgG, IgA ou IgM ao local do antígeno correspondente. Para que ocorra diferenciação dos anticorpos ligados, é adicionada uma IgG anti-humana marcada por um conjugado enzimático capaz de catalisar uma reação de cor. Após uma segunda incubação, verifica-se uma coloração na zona da tira correspondente ao antígeno específico se a reação for positiva.<sup>34,47</sup>

Esta técnica é utilizada como teste confirmatório dos resultados obtidos, por exemplo, por Imunofluorescência indireta de modo a clarificar alguns dos padrões de fluorescência obtidos.



**Figura 28.** Tira-teste para determinação qualitativa de autoanticorpos humanos da classe IgG para dezasseis antígenos diferentes.

(Adaptado de: "EUROLINE ANA Profile 3 plus DFS70 (IgG)", 2019)

## **Imunoquímica**

### **Eletroforese de Proteínas**

A Eletroforese consiste na migração de solutos ou partículas carregadas num campo elétrico. Este método analítico envolve o movimento de partículas carregadas quando aplicada uma corrente elétrica externa. É uma técnica utilizada na separação e purificação de iões, proteínas e outras moléculas com interesse clínico.<sup>38</sup>

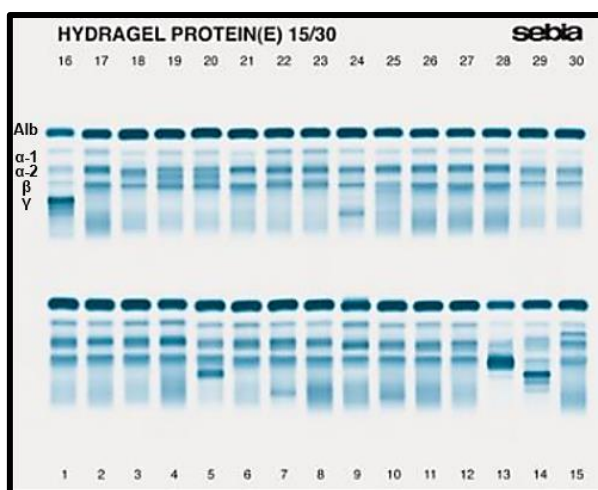
A utilização da Eletroforese de Proteínas tem como principal objetivo a deteção precoce de bandas monoclonais quando existe a suspeita de gamopatia monoclonal. Uma patologia desta natureza é detetada quando é identificada uma proteína monoclonal no soro, urina ou em ambos.<sup>37</sup>

A amostra de soro ou urina de 24 horas a analisar é aplicada em gel de agarose. De seguida, o mesmo é exposto a uma corrente elétrica na presença de uma solução tampão. As várias proteínas são separadas e migram pelo gel com base na sua carga elétrica. Após a migração, as proteínas são fixadas ao gel para evitar a difusão dos componentes da amostra e coradas de modo a diferenciar as várias frações proteicas. Por fim, o gel é colocado num densitómetro com o objetivo de quantificar cada uma das frações.<sup>37</sup>

O proteínograma pode ser efetuado através do equipamento Hydrasys 2 da Sebia®, onde é utilizado o corante negro de amido e são separadas cinco frações proteicas: albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama globulinas.

Na eletroforese de proteínas no soro, a albumina é a principal proteína sérica surgindo em maior quantidade. Esta proteína permanece no ponto de aplicação, ou seja, junto ao ânodo. As restantes frações vão migrando em direção ao cátodo, sendo identificadas pela ordem alfa-1, alfa-2, beta e gama globulinas.

A eletroforese de proteínas na urina é semelhante à que decorre no soro. A albumina é excretada na urina ao contrário de outras proteínas cujo peso molecular não lhes permite a filtração pelo rim e conseqüente excreção. Contudo, a proteína de maior interesse é a proteína de Bence Jones, encontrada em doentes com Mieloma Múltiplo. O perfil eletroforético obtido é, na maioria das vezes, inconclusivo porque apenas é visível a fração albumina.



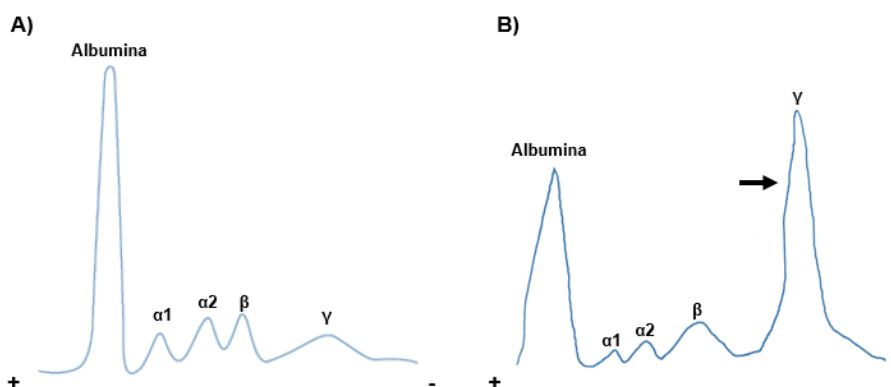
**Figura 29.** Exemplo de gel de agarose obtido através da realização de Eletroforese de Proteínas em amostra de soro no equipamento Hydrasys 2 da Sebia<sup>®</sup>. É possível observar as diferentes frações proteicas resultantes da migração eletroforética com base na carga elétrica de cada proteína. Na banda (16) distinguem-se facilmente as cinco frações proteicas: albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama globulinas.

(Adaptado de: “Hydrigel Protein(e) – High Performance Gel Electrophoresis for Serum Analysis”)

Disponível em: <https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydrigel-proteine> ; Acesso em Setembro, 2020

O maior interesse clínico encontra-se na observação de picos monoclonais nas frações alfa-2, beta e gama globulinas, podendo-se tratar de gamopatias monoclonais. No entanto, é na fração gama que migram as imunoglobulinas sendo essa a zona de maior interesse. É requerida a realização de eletroforese de proteínas em casos de suspeita de Mieloma Múltiplo e quando é quantificada a presença de uma paraproteína, indica gamopatia monoclonal.<sup>8,37</sup>

Quando é observado um pico monoclonal procede-se à realização da técnica de Imunofixação com o objetivo de identificar quais as imunoglobulinas responsáveis por esse mesmo pico.



**Figura 30.** Perfis Eletroforéticos de Proteínas. (A) Perfil Eletroforético de Proteínas de Referência; (B) Perfil Eletroforético de Proteínas onde se observa um pico monoclonal na região  $\gamma$ , correspondente a uma valor elevado de IgG.

(Adaptado de: “Linnê and Ringsrud’s Clinical Laboratory Science- Concepts, Procedures and Clinical Applications”, 7ª edição, 2015; “Hematologia-Da Prática Clínica à Teoria”, 2015)

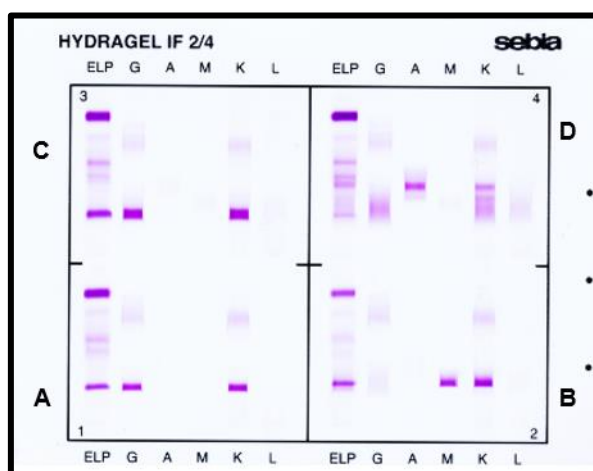
## Imunofixação

A Imunofixação é um procedimento que se desenvolve em duas fases: eletroforese em gel de agarose e imunoprecipitação.

Numa primeira fase, a amostra de soro ou urina é colocada no gel de agarose, em semelhança à técnica anteriormente descrita, e as proteínas presentes são separadas em função da sua mobilidade eletroforética nas cinco principais frações: albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama globulinas. De seguida, a amostra é exposta a um conjunto de diferentes anticorpos monoclonais: anti-gamma, anti-mu, anti-alpha, anti-kappa e anti-lambda. As frações proteicas vão atuar como antígenos e interagir com os anticorpos correspondentes. Ao ocorrer a reação antígeno-anticorpo, é formado um imunoprecipitado que se torna visível através do surgimento de uma banda. Ocorre, por fim, uma lavagem do gel para remover os anticorpos não ligados e a coloração do gel permitindo a identificação do isótopo específico da proteína monoclonal. <sup>37,38,48</sup>

A referida técnica apresenta uma elevada sensibilidade quando comparada com a Eletroforese de Proteínas. A Imunofixação tem a capacidade de confirmar a existência de uma paraproteína, no entanto, não consegue quantificá-la como acontece na Eletroforese de Proteínas. <sup>37</sup> É, por isso, vantajoso utilizar ambas as técnicas de modo a completar o diagnóstico de gamopatia monoclonal.

A Imunofixação pode ser realizada no equipamento Hydrasys da Sebia<sup>®</sup> em que o corante utilizado é o Violeta Ácido.



**Figura 31.** Imunofixação em amostra de soro para classificação de proteína monoclonal através do equipamento Hydrasys 2 da Sebia<sup>®</sup>. Em (A) verifica-se a existência de uma proteína monoclonal IgM do tipo kappa, em (B) observa-se uma proteína monoclonal IgM do tipo kappa. (C) evidencia a presença de uma proteína monoclonal do tipo IgG kappa e (D) uma proteína monoclonal IgA kappa. A banda ELP tem como função auxiliar na identificação das diversas bandas.

(Adaptado de: "Hydrashift 2/4 Daratumumab – Mitigate Daratumumab Interference on Immunofixation for Darzalex<sup>®</sup> Treated Patients")

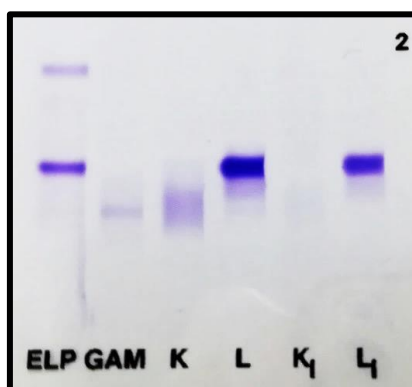
Disponível em: <https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydrashift-24-daratumumab>; Acesso em Setembro, 2020

### Imunofixação na Urina

A proteína de Bence Jones é uma proteína encontrada na urina de doentes com Mieloma Múltiplo e define-se como cadeias leves livres lambda ou kappa monoclonais.<sup>48</sup>

No Mieloma Múltiplo, muitas vezes, apenas são produzidas cadeias leves livres. A concentração destas cadeias leves no soro é bastante diminuta sendo indetetável por Eletroforese de Proteínas e até mesmo por Imunofixação. A utilização de uma amostra de urina de 24 horas é bastante útil porque permite a deteção das cadeias leves livres que, devido ao seu peso molecular baixo, são excretadas pelo rim quando em concentrações elevadas.<sup>37</sup>

A Imunofixação na urina é semelhante à que acontece em amostras de soro, no entanto, o conjunto de anticorpos monoclonais utilizado é diferente porque pretende detetar cadeias leves livres. Os anticorpos monoclonais são anticorpos anti cadeias pesadas IgG, IgA e IgM, e anti-cadeias livres kappa e lambda.



**Figura 32.** Imunofixação em amostra de urina para pesquisa da presença de Proteína de Bence Jones através do equipamento Hydrasys 2 da Sebia<sup>®</sup>. É possível observar a presença de uma banda na região lambda e outra na região das cadeias livres lambda, o que significa que este doente apresenta uma Proteína de Bence Jones positiva do tipo  $\lambda$ .

(Fonte: Aatoria da Própria)

## **Serologia Manual**

A serologia manual, à semelhança das restantes técnicas de imunologia, trabalha com a interação anticorpo-antigénio utilizando-a no diagnóstico da presença de diversos agentes patogénicos.

A interação anticorpo-antigénio pode ser detetada, laboratorialmente, por diversos métodos tais como a precipitação, aglutinação, hemaglutinação, entre outros.

### **Aglutinação Direta**

As reações de aglutinação consistem num processo onde antigénios específicos se agregam formando aglomerados visíveis aquando da presença do respetivo anticorpo no soro. São bastante utilizadas em Serologia devido à sua facilidade de utilização, à preparação simples dos reagentes a utilizar e rapidez de resultados obtidos. A maioria dos testes de aglutinação são qualitativos identificando a presença ou ausência do antigénio ou anticorpo a determinar, no entanto, procedendo à realização de sucessivas diluições da amostra é possível obter resultados semi-quantitativos. <sup>48,49</sup>

Na reação de Aglutinação Direta é utilizado o próprio agente patogénico para detetar anticorpos específicos contra o mesmo. O resultado do contato entre os anticorpos presentes no soro e a superfície do agente patogénico leva à formação de aglomerados visíveis. O melhor exemplo deste tipo de reação são os testes que utilizam antigénios bacterianos para determinar a presença de anticorpos específicos na amostra em análise. <sup>48,50</sup>

### **Reação de Wright**

A *Brucella abortus* é a bactéria responsável pela brucelose, uma zoonose que afeta, principalmente, gado bovino. Pode ser transmitida ao ser Humano diretamente de animais doentes ou indiretamente através de comida. Provoca o aparecimento de granulomas característicos nos órgãos do Sistema Retículo Endotelial sendo a febre ondulante o sintoma clínico primário. <sup>51</sup>

A reação de Wright é um teste serológico de aglutinação direta utilizado no diagnóstico de infeção por *Brucella abortus*. Consiste na colocação da amostra juntamente com uma suspensão de bactérias inativas. A amostra é diluída sucessivamente até à diluição 1:320. Se existirem anticorpos específicos para os antigénios presentes ocorre aglutinação. Os complexos resultantes da interação antigénio-anticorpo são visíveis a nível macroscópico e é registada o título de anticorpos existente, ou seja, o número da

última diluição onde é visível aglutinação. Um título superior ou igual a 1:80 indica que a infecção é recente.<sup>52</sup>

Se se verificar uma positividade num título superior a 1:320 procede-se à realização do Teste de Rosa Bengala, cujo princípio se baseia na prova ao antígeno tamponado. É uma reação de aglutinação rápida que utiliza como suspensão bacteriana *Brucella abortus* corada de Rosa Bengala em meio ácido tamponado. Após a mistura do antígeno Rosa Bengala com o soro, verifica-se o aparecimento de aglutinados corados em caso de Brucelose.<sup>53</sup>

### **Teste de Widal**

A *Salmonella* é uma bactéria entérica patogénica para o ser humano e animais, sendo adquirida, sobretudo, por via oral. O ser humano é infetado através do contato com animais ou pela ingestão de produtos animais infetados podendo provocar enterite, infeções sistémicas e febre entérica ou febre tifoide.<sup>54</sup>

A classificação das bactérias pertencentes ao género *Salmonella* é bastante complexa, tendo sido originalmente feita com base na epidemiologia, hospedeiros, reações bioquímicas e antígenos somáticos (O), flagelares (H) e de superfície (Vi). Os serotipos com maior interesse clínico são a *Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Paratyphi B* e *Salmonella Typhi* responsáveis pelas febres paratifoide e tifoide, respetivamente.<sup>54</sup>

A identificação serológica destas bactérias é realizada através do Teste de Widal. Neste teste é determinada a presença dos anticorpos anti-O e anti-H presentes no soro do doente por aglutinação direta das bactérias *Salmonella* em suspensão.<sup>54</sup> Para a *S. Typhi* são determinados os antígenos O e H, e para a *S. Paratyphi* os antígenos AH e BH. Cada suspensão antigénica bacteriana apresenta uma coloração característica que permite evidenciar a aglutinação resultante da presença de anticorpos homólogos na amostra testada.

São realizadas diversas diluições da amostra de modo a fazer uma semi-quantificação dos anticorpos presentes. Se o título obtido for inferior a 1:80, considera-se o resultado negativo.

## VDRL e RPR

A Sífilis é uma infecção provocada pela bactéria *Treponema pallidum*. Pode ser transmitida por via sexual, sendo denominada de Sífilis adquirida, ou por transmitida verticalmente, denominada de Sífilis congênita.

Esta infecção pode ser detetada através de testes não-treponémicos, que detetam anticorpos não específicos para *T. pallidum*, e testes treponémicos cujos anticorpos detetados são específicos para a bactéria causadora de Sífilis.

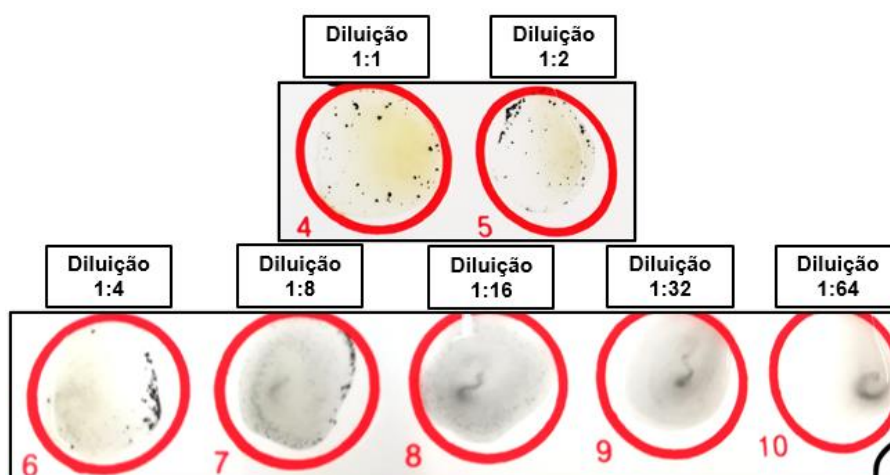
Os testes não-treponémicos determinam a presença de reaginas, anticorpos contra um conjunto antigénico composto por cardiolipina, colesterol e lecitina. Estes testes baseiam-se em reações de floculação em que os anticorpos presentes na amostra de soro complexam o antígeno cardiolipina. Os resultados obtidos podem ser qualitativos ou semi-quantitativos através da realização de diversas diluições, onde a quantidade de reagina presente é dada pela diluição mais alta onde se verifica um resultado positivo.

48,54

O VDRL (*Venereal Disease Research Laboratories*) é um teste não-treponémico utilizado na determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos reagina em soro. O complexo antigénico é adicionado a uma solução salina tampão formando-se uma emulsão de partículas muito finas. Essas partículas vão flocular na presença do anticorpo reagina, produzindo um resultado visível ao microscópico. A ausência de floculação indica um resultado negativo.<sup>55</sup>

O teste de RPR (*Rapid Plasma Reagin*) é uma modificação do teste de VDRL devido à adição de partículas de carvão o que melhora a leitura visual do resultado. Quando ocorre a ligação entre o complexo cardiolipina-colesterol-lecitina e as reaginas na amostra, a aglutinação resultante pode ser observada macroscopicamente pela observação de aglomerados pretos.<sup>56</sup>

Resultados positivos em testes não-treponémicos desenvolvem-se após duas a três semanas de Sífilis não tratada e reverterem a negativo depois de um tratamento efetivo de, pelo menos, seis meses. Se for obtida positividade após tratamento, o mesmo pode não ter sido efetivo ou pode resultar de uma reinfeção. Os resultados devem ser sempre confirmados por testes treponémicos.<sup>54</sup>



**Figura 33.** Resultado de teste de RPR (*Rapid Plasma Reagin*) para diagnóstico de anticorpos anti- *Treponema pallidum*. A amostra é diluída com uma solução salina tampão até à diluição de 1:64. É adicionado o reagente composto pelo complexo antigénico cardiolíplina-colesterol-lecitina e por partículas de carvão que melhoram a leitura visual do resultado. Este doente apresenta um título de 1:16, diluição até onde é visível aglutinação.

(Fonte: Autoria da Própria)

## Hemaglutinação

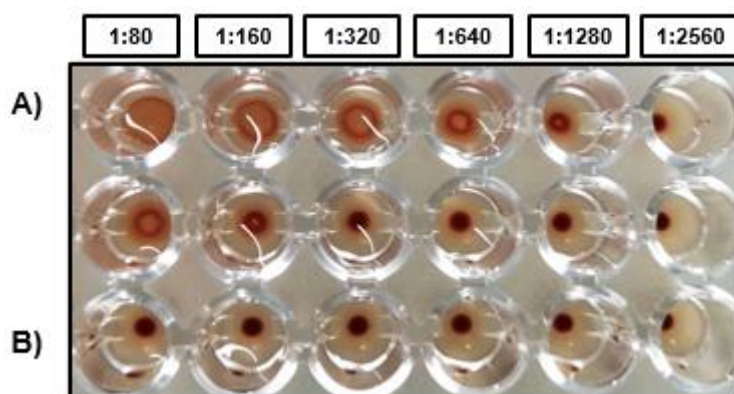
Os testes de Hemaglutinação baseiam-se na deteção de anticorpos contra antígenos eritrocitários. Se estiver presente na amostra uma concentração elevada de anticorpos, os eritrócitos são aglutinados e o resultado é visível macroscopicamente.

### TPHA

O teste de TPHA (*T. pallidum-particle agglutination*) é um teste treponémico utilizado na deteção de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, agente bacteriano responsável pela Sífilis.<sup>54</sup> Os testes treponémicos são utilizados para confirmar o resultado obtido pelos testes não-treponémicos, como referido anteriormente.

O TPHA é um ensaio de hemaglutinação indireta que utiliza eritrócitos de aves sensibilizados para *T. pallidum* que irão aglutinar com os anticorpos IgG e IgM presentes no soro ou plasma do doente.<sup>50</sup>

O teste é executado em placas de microtitulação onde é colocado o reagente composto pelos eritrócitos de ave sensibilizados. Após a adição da amostra diluída, se os anticorpos anti- *T. pallidum* estiverem presentes, ocorre uma reação antígeno-anticorpo que provoca a aglutinação das células formando um padrão característico no fundo do poço. Na ausência de anticorpos, forma-se um botão compacto no fundo do poço da placa de microtitulação.<sup>57</sup>



**Figura 34.** Teste de TPFA (*T. pallidum-particle agglutination*) para deteção de anticorpos anti- *Treponema pallidum*. O teste realiza-se em placas de microtitulação onde são adicionados eritrócitos de ave sensibilizados para a bactéria em questão. A amostra é diluída até uma diluição de 1:2560 e colocada em contacto com os antígenos presentes nos glóbulos vermelhos. Se estiverem presentes anticorpos, ocorre aglutinação dos eritrócitos e forma-se um padrão característico no fundo do poço. Em (A) o soro é positivo com um título de 1:1280 porque na diluição seguinte se observa um botão compacto, sinal de negatividade. Em (B) não ocorreu aglutinação dos eritrócitos porque se verifica o padrão de negatividade em todas as diluições.

(Fonte: Autoria da Própria)

### **Teste de Waaler Rose**

Como referido anteriormente, as doenças autoimunes surgem devido à incapacidade do sistema imunitário em discriminar os antígenos “self”, próprios do organismo, dos antígenos “non-self”, antígenos exógenos. Um exemplo é a Artrite Reumatoide, doença autoimune crónica, onde é provocada uma inflamação crónica na membrana sinovial que envolve as articulações e os tendões. São produzidos autoanticorpos com influência no decurso da doença, tal como o Fator Reumatoide (FR). O FR uma vez no soro já não desaparece, mesmo em estados de remissão da doença.<sup>50,58</sup>

O método de deteção do FR mais utilizado em laboratório é o Teste de Waaler Rose. Este teste é um teste rápido de hemaglutinação para determinação qualitativa e semi-quantitativa do FR. São utilizados eritrócitos sensibilizados com IgG que, ao contactar com o FR presente no soro, aglutinam evidenciando a sua presença.<sup>58</sup>

Contudo, o FR pode ser detetado noutras patologias e também em indivíduos saudáveis. É recomendada a medição de outros anticorpos juntamente com o FR de modo a melhorar a precisão do diagnóstico.<sup>58</sup>

## **Imunoensaios Cromatográficos**

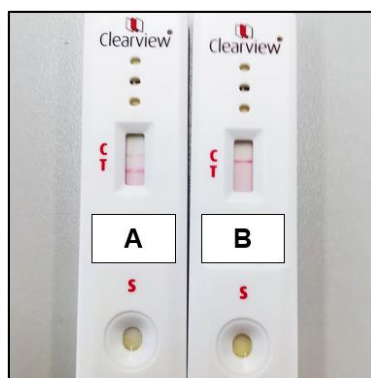
### **Teste rápido para o diagnóstico de Mononucleose Infeciosa**

O vírus Epstein-Barr (EBV) é o vírus responsável pela Mononucleose Infeciosa (MI) e por diversos cancros, como o Linfoma de Burkitt. As infeções por este vírus resultam, principalmente, do contacto íntimo com secreções salivares de indivíduos infetados. A MI é uma condição linfoproliferativa autolimitada, aguda e benigna em que a maioria dos doentes apresenta anticorpos anti-EBV sem sinais ou sintomas significativos. <sup>38</sup>

O diagnóstico da MI assenta, sobretudo, em estudos hematológicos e na deteção de anticorpos anti-EBV. Os anticorpos detetados são classificados como anticorpos heterófilos, definidos como anticorpos que são estimulados por um antígeno, mas que reagem com diversos antígenos de superfície presentes em células de diferentes espécies de mamíferos. <sup>38</sup>

O teste rápido de diagnóstico da MI é um imunoensaio cromatográfico rápido que deteta, qualitativamente, a presença de anticorpos heterófilos característicos desta patologia em sangue total, soro ou plasma como meio auxiliar de diagnóstico. O teste utiliza um extrato de eritrócitos bovinos para detetar os referidos anticorpos. <sup>59</sup>

É utilizada uma cassette onde é colocado o antígeno extraído dos eritrócitos bovinos imobilizado na região da linha teste. Durante o teste, a amostra irá reagir com as partículas revestidas do antígeno extraído migrando por cromatografia pela tira teste. Se a amostra contiver anticorpos heterófilos específicos de MI, aparecerá uma linha colorida na região da linha teste, o que indica um resultado positivo. Caso a amostra não contenha anticorpos heterófilos não surge nenhuma linha colorida nesta região, sendo o resultado negativo. Para controlar todo o procedimento, existe uma região controlo na cassette que, caso surja uma linha colorida, indica que foi adicionado o volume correto de amostra e que ocorreu o escorrimento da membrana, sendo o resultado fiável. <sup>59</sup>



**Figura 35.** Teste rápido para diagnóstico da Mononucleose Infeciosa (MI). São utilizados antígenos extraídos de eritrócitos bovinos que reagem com anticorpos heterófilos específicos da MI. Cada cassete apresenta uma linha controle (C) que assegura a fiabilidade do teste e uma linha teste (T) onde se observa o resultado. Em (A) observa-se um resultado positivo devido ao surgimento de uma linha colorida na região teste. Em (B) o resultado é negativo, estando presente apenas uma linha colorida na região controle.

(Fonte: Autoria da Própria)

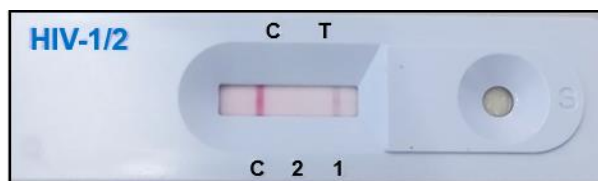
### **Teste Rápido Anti-HIV-1/2**

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o vírus responsável pelo Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Este agente patológico ataca o sistema imunitário do seu hospedeiro expondo-o a diversas infecções bacterianas, virais e fúngicas. O contágio deve-se ao contato com secreções, excreções, sangue e tecidos que contêm o vírus. Divide-se em dois tipos de vírus: HIV-1 e HIV-2. O vírus HIV do tipo 1 é responsável pela SIDA epidémica enquanto o HIV-2 é um vírus endémico em determinadas zonas do globo. Diferem entre si, sobretudo, devido às proteínas que compõem o envelope e a estrutura nuclear. <sup>49,60</sup>

O diagnóstico da infeção por HIV pode ser realizado através da deteção de anticorpos anti-HIV, de antígenos específicos e de ácidos nucleicos virais. Numa tentativa de testagem de um maior número de indivíduos, surgiram os testes rápidos que permitem detetar a presença de anticorpos anti-HIV rapidamente, sendo simples a sua execução e o método bastante sensível. <sup>38,48</sup>

O teste rápido Anti-HIV-1/2 é um teste qualitativo para a deteção de anticorpos IgA, IgM e IgG específicos para HIV-1 e HIV-2 em soro humano, plasma ou sangue total. O teste contém uma tira membrana que está revestida com antígenos recombinantes de HIV-1 (gp41, p24) na linha de teste número um e com um antígeno recombinante de HIV-2 (gp36) na linha teste número dois. Os antígenos recombinantes, que em conjunto formam um conjugado coloide de ouro, juntamente com a amostra migram ao longo da tira teste por cromatografia até à região teste (T). Se ocorrer interação anticorpo-partícula de ouro antigénica, o complexo formado liga-se a um conjugado enzimático

que produz uma linha visível por colorimetria. O dispositivo teste ainda uma terceira linha teste que corresponde à linha controlo. <sup>48,61</sup>



**Figura 36.** Teste rápido de diagnóstico de infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) do tipo 1 e 2. O complexo antigénio-anticorpo liga-se a um conjugado enzimático que origina uma linha visível por colorimetria. A linha **(C)** corresponde à linha teste controlo, a linha **(T)** à linha teste onde na linha **(1)** estão os antigénios HIV-1 e na linha **(2)** os antigénios HIV-2. No exemplo apresentado, observa-se uma linha visível na região **(1)** o que indica infecção por HIV-1.

(Fonte: Autoria da Própria)

## Bioquímica

A Bioquímica é uma área científica que estuda a concentração dos mais diversos analitos nos fluidos biológicos.

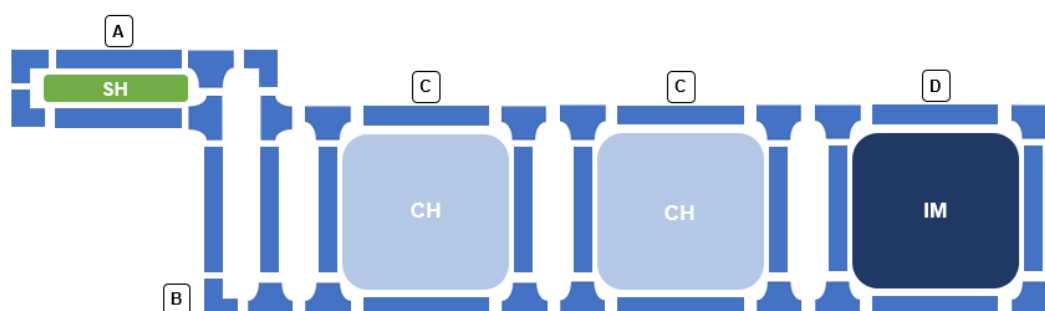
As análises bioquímicas são primordiais no estudo da doença permitindo o diagnóstico e monitorização da terapêutica, sendo igualmente relevantes na construção de um prognóstico uma vez estabelecido o diagnóstico. <sup>62</sup>

Em todos os laboratórios de análises clínicas, a secção de bioquímica proporciona um conjunto de testes analíticos que se estabelecem como parâmetros bioquímicos base, como é o caso da ureia e creatinina. Para além disso, existem também analitos adicionais que são requeridos em situações clínicas mais restritas, como na análise de vitaminas e hormonas. <sup>62</sup>

No capítulo referente a esta área analítica, são descritos métodos analíticos utilizados na quantificação de diversos analitos, a sua importância no organismo humano e como podem os mesmos enunciar a presença de patologia.

## Atellica® Solution

Na secção de bioquímica, a maioria dos parâmetros bioquímicos é realizada no conjunto de analisadores Atellica® Solution. Este analisador integra analisadores de imunologia e química clínica juntamente com uma tecnologia de gestão de amostras. É, sobretudo, é um sistema modular composto por diversos equipamentos como o Atellica® Sample Handler (SH), Atellica® Chemistry Analyzer (CH), Atellica® Immunoassay Analyzer (IM) e Atellica Magline® Transport. <sup>63,64</sup>



**Figura 37. Representação da cadeia formada pelos vários equipamentos que compõe o Atellica® Solution.** Em (A) está representado o Atellica® Sample Handler (SH) cuja função é processar amostras. Em (B) encontra-se o Atellica Maligne® Transport que conecta todos os componentes do circuito. O Atellica® Chemistry Analyzer (C) é um analisador de química clínica e o Atellica® Immunoassay Analyzer (D) um analisador de imunensaio.

(Fonte: A autoria da Própria)

## Parâmetros Bioquímicos

### Avaliação da Função Renal

O Rim é um órgão par que se localiza na região retroperitoneal do corpo. A sua unidade base funcional e estrutural é o nefrónio. Cada um dos nefrónios que o compõe são compostos por glomérulos e pelo túbulo renal. <sup>65</sup>

Estes órgãos desempenham diversas funções no organismo, incluindo a filtração do sangue, metabolismo e excreção de compostos endógenos e exógenos, e funções endócrinas. Mantêm a homeostasia devido à regulação de fluidos, equilíbrio ácido-base e balanço eletrolítico. <sup>65</sup>

## Função Glomerular

### Creatinina

A Creatinina é formada através da creatina, composto esse sintetizado no rim, fígado e pâncreas. A creatina é transportada pela corrente sanguínea a outros órgãos como o músculo e cérebro, onde é fosforilada a fosfocreatina. Os níveis de creatinina dependem da massa muscular, permanecendo constantes de dia para dia a não ser que existam alterações na massa muscular ou alterações renais. <sup>66,67</sup>

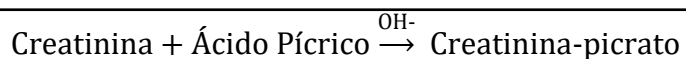
Este produto endógeno é um marcador do grau de filtração glomerular (GFR). A creatinina é filtrada livremente pelo glomérulo estando a sua concentração inversamente relacionada com o GFR. No entanto, este marcador da função glomerular é afetado por diversos fatores biológicos como a idade, sexo, exercício físico, massa muscular, entre outros. <sup>68</sup>

A clearance da creatinina corresponde à medição da quantidade de creatinina eliminada do sangue pelos rins. Esta medição fornece uma aproximação fiável ao GFR o que torna a creatinina um bom marcador endógeno. É bastante útil na deteção de doença renal precoce e na determinação da extensão do dano do nefrónio em casos conhecidos de doença renal, sendo um dos parâmetros mais requeridos num laboratório de Análises Clínicas. <sup>69,70</sup>

$$\text{Clearance da Creatinina} = \frac{U_{Cr} V_U}{P_{Cr}}$$

**Equação 3.** Fórmula de cálculo da clearance da creatinina.

O ensaio analítico para determinação da creatinina sérica é realizado com base no método de Jaffe. A creatinina presente na amostra reage com o ácido pícrico em meio alcalino de modo a originar um complexo de creatinina picrato vermelho. A velocidade de formação do referido complexo é medida a um comprimento de onda entre os 505 e 571 nm, sendo essa proporcional à concentração do analito em solução. <sup>71</sup>



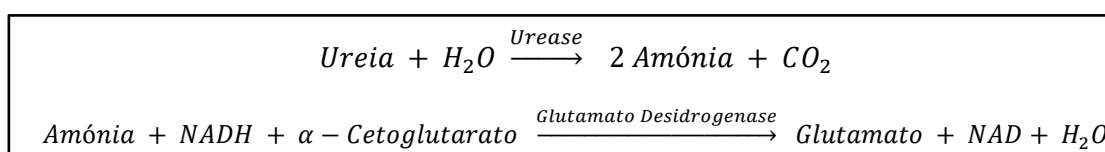
**Equação 4.** Equação da reação de quantificação da creatinina através da adição de ácido pícrico. <sup>71</sup>

## Ureia

A Ureia é o composto nitrogenado não proteico (NPN) em maior concentração no sangue. É formada no fígado a partir dos grupos amino e da amónia livre gerada durante o catabolismo proteico. <sup>69</sup>

A maioria da ureia é excretada através dos rins o que, por consequência, está associado a doença renal com a acumulação de ureia no sangue. Este analito é livremente filtrado pelo glomérulo sendo, no entanto, reabsorvida ativamente pelos túbulos renais. A concentração de ureia no plasma é indicadora da função e perfusão renais, dependendo do conteúdo proteico da dieta e do catabolismo das proteínas. Para além disso, é também bastante relevante na monitorização dos resultados da hemodiálise. <sup>67,69</sup>

O método de determinação do referido analito é enzimático e inclui a utilização de urease e glutamato desidrogenase. A ureia sofre um processo de hidrólise na presença de água e urease, produzindo amónia e dióxido de carbono. A amónia gerada reage com 2-oxoglutarato na presença de glutamato desidrogenase e nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido (NADH). O NADH é oxidado a nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) sendo essa oxidação medida a 340 ou 410 nm. <sup>72</sup>



**Equação 5.** Equação da reação de quantificação do nitrogénio ureico através da utilização de urease e glutamato desidrogenase. <sup>72</sup>

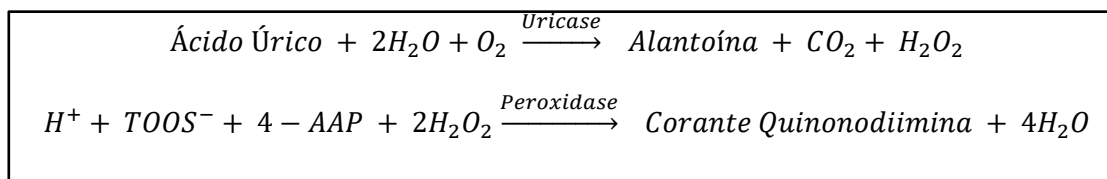
## Ácido Úrico

O Ácido Úrico é um produto do catabolismo das purinas, adenina e guanina. As purinas provenientes da decomposição dos ácidos nucleicos ou da destruição tecidual são convertidas em ácido úrico, maioritariamente, no fígado. Este produto é transportado pelo plasma do tecido hepático até aos rins, onde é filtrado pelo glomérulo. <sup>69</sup>

Um aumento dos níveis séricos deste analito indica um aumento da síntese de nucleoproteínas ou decréscimo da excreção renal, o que evidencia falha desses mesmos órgãos. <sup>8</sup>

Os métodos de determinação que utilizam uricase, a enzima que catalisa a oxidação do ácido úrico a alantoína, são os métodos mais específicos e mais comumente utilizados em laboratórios de análises clínicas. No entanto, são também utilizados métodos

enzimáticos onde é medido o peróxido de hidrogénio produzido como ácido úrico e convertido em alantoína. <sup>69</sup>



**Equação 6.** Equação da reação de quantificação do ácido úrico através de reação enzimática com uricase e peroxidase. <sup>73</sup>

## Permeabilidade Glomerular

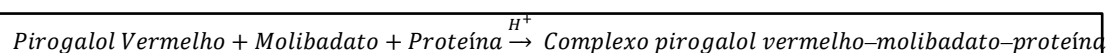
### Proteinúria

O glomérulo atua como um filtro seletivo da passagem do sangue através dos capilares, restringindo a passagem de macromoléculas com base no seu tamanho, carga e forma. A permeabilidade e capacidade de filtração do rim controlam a quantidade de proteína excretada através da urina. <sup>74</sup>

O termo proteinúria refere-se à excreção anómala de proteínas através da urina. As proteínas observadas na urina têm origem no sangue, no entanto, podem ser provenientes do rim, trato urinário, vagina e próstata. As proteínas plasmáticas surgem na urina porque passaram pelo glomérulo renal não tendo sido absorvidas pelos túbulos renais. <sup>3,62</sup>

Concentrações elevadas de proteínas na urina podem resultar de doença glomerular, doença tubular, de elevadas concentrações de proteínas plasmáticas como imunoglobulinas em pacientes com mieloma. <sup>75</sup>

O método de determinação das proteínas totais na urina é um método químico a ponto final, sendo utilizada uma amostra de urina de vinte e quatro horas. As proteínas presentes na urina são medidas através da variação de absorção que sucede aquando da ligação do complexo pirogalol vermelho-molibdato aos grupos amino protonados a um pH ácido. O aumento da absorvância que se verifica entre os 596 e 694 nm é diretamente proporcional à concentração de proteína presente na amostra. <sup>74,76</sup>



**Equação 7.** Equação da reação de quantificação das proteínas totais presentes na urina. As proteínas em solução reagem com o pirogalol vermelho-molibdato, formando um complexo. <sup>76</sup>

### **Albuminúria**

A albumina é a maior proteína plasmática sintetizada e secretada pelo fígado, sendo bastante importante na manutenção da pressão oncótica do fluido intravascular.<sup>62</sup>

Albuminúria define-se como o aumento da excreção urinária de albumina em concentrações anómalas não detetáveis pelos testes utilizados na avaliação da urina. A medição deste parâmetro analítico é útil no diagnóstico precoce de proteinúria.<sup>3,8,62</sup>

O aparecimento de albumina na urina está associado, muitas vezes, à Diabetes mellitus. Esta doença provoca alterações progressivas nos rins levando ao surgimento de nefropatia diabética, sendo a microalbuminúria um parâmetro indicativo de dano renal.<sup>3</sup>

O ensaio de determinação da albumina presente em amostras de urina utiliza imunoturbidimetria reforçada com polietileno glicol como princípio analítico. A amostra é diluída pelo equipamento analítico e se estiver presente albumina a mesma reage com um antissoro específico formando um precipitado. O composto resultante é medido turbidimetricamente entre os 340 e 596 nm. Recorrendo às absorvâncias dos padrões é construída uma curva padrão a partir da qual é determinada a concentração da albumina na amostra.<sup>77</sup>

### **Função Reguladora**

Os eletrólitos são íões com a capacidade de transportar uma carga elétrica. São componentes essenciais em diversos processos como no volume e regulação osmótica, no ritmo miocárdico e contratilidade, excitabilidade neuromuscular, entre outros.<sup>3</sup>

Os principais eletrólitos são o sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Estes íões são analisados em conjunto porque uma alteração na concentração de um, pode vir acompanhada de alterações em um ou mais eletrólitos. É por isso importante que exista um equilíbrio entre os as partículas de carga positiva e as de carga negativa. Os rins e os pulmões são os principais órgãos responsáveis pela manutenção da concentração eletrolítica pelo que, se o organismo não mantiver as concentrações adequadas de eletrólitos, através da excreção ou conservação, é originado um desequilíbrio.<sup>38</sup>

### **Sódio**

O Na<sup>+</sup> é o principal catião do organismo, encontrando-se em elevadas concentrações no fluido extracelular. Apresenta um papel bastante relevante na manutenção da pressão osmótica e no equilíbrio eletrolítico. A regulação da concentração deste eletrólito depende da ingestão e excreção de água, e também da regulação renal. <sup>3,38</sup>

A concentração sérica de Na<sup>+</sup> pode sofrer alterações originando situações de Hiponatremia e Hipernatremia. A Hiponatremia decorre de baixas concentrações de sódio no soro e pode dever-se a Poliúria, Acidose Metabólica, Diarreia e algumas doenças renais tubulares. A Hipernatremia consiste em concentrações elevadas do referido ião que podem surgir em casos Falha Cardíaca Congestiva, Ascite e Síndrome Nefrótico. <sup>38</sup>

### **Potássio**

O K<sup>+</sup> é o principal catião intracelular, apresentando uma concentração vinte vezes maior dentro das células do que no exterior. A concentração de potássio influencia bastante a contração do esqueleto e dos músculos cardíacos, sendo imprescindível no potencial de membrana celular. A regulação deste eletrólito está a cargo, principalmente, do sistema renal. <sup>3,62</sup>

A desregulação dos níveis de K<sup>+</sup> no organismo é bastante preocupante porque é alterada a excitabilidade das células que respondem de forma diferente aos estímulos. No caso das células cardíacas, as consequências podem ser fatais e originar, por exemplo, arritmias. <sup>62</sup>

A Hipocaliemia é a condição resultante de baixas concentrações do ião K<sup>+</sup> no organismo. Pode resultar de Diarreia ou vômitos prolongados, ou de uma ingestão inadequada de potássio na dieta. O organismo não possui um mecanismo efetivo que o proteja da perda excessiva deste catião, sendo a ingestão diária essencial. <sup>38</sup>

Níveis elevados deste eletrólito no soro originam Hipercaliemia. Esta situação pode ocorrer aquando de disfunção renal ou obstrução urinária, devido ao facto do K<sup>+</sup> ser excretado, primariamente, pelo rim. Verifica-se também em casos de Hipoaldosteronismo. <sup>38,62</sup>

## **Cloro**

O  $\text{Cl}^-$  é o principal anião extracelular, estando envolvido na manutenção da osmolaridade, volume sanguíneo e neutralidade elétrica. Está diretamente relacionado com o  $\text{HCO}_3^-$ , onde um decréscimo de um deles conduz ao aumento do outro. Para além disso, contrabalança o principal catião extracelular, o  $\text{Na}^+$ .<sup>38</sup>

O cloro ingerido através da dieta é completamente absorvido no trato intestinal sendo, posteriormente, filtrado pelo glomérulo renal e reabsorvido passivamente, em conjunto com o  $\text{Na}^+$  pelos túbulos proximais. Por esse motivo, algumas das patologias associadas a este anião resultam das mesmas causas que provocam alterações na concentração de sódio.<sup>3</sup>

A Hipoclorémia é a condição resultante de concentrações reduzidas de  $\text{Cl}^-$  podendo dever-se a perdas excessivas do mesmo através vómitos, cetoacidose diabética ou deficiência de aldosterona. Está associada igualmente a concentrações elevadas de  $\text{HCO}_3^-$  em casos de alcalose metabólica ou de acidose respiratória compensada.<sup>3</sup>

A Hiperclorémia resulta de concentrações elevadas do anião cloro surgindo devido a perdas excessivas de bicarbonato pelo trato gastrointestinal ou acidose metabólica.<sup>3</sup>

## **Determinação dos Iões $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ e $\text{Cl}^-$**

A determinação do  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  é concretizada por via da utilização de elétrodos seletivos para os iões em questão. Um elétrodo seletivo para um ião (ISE) é um transdutor eletroquímico capaz de responder a um ião específico. Consiste numa membrana ou numa barreira que separa uma solução e elétrodo de referência da solução a ser analisada.<sup>78</sup>

O método analítico ISE utiliza uma membrana semipermeável para desenvolver um potencial produzido por diferentes concentrações dos iões presentes na membrana. É utilizado um elétrodo com um potencial constante, denominado de elétrodo de referência. A diferença de potencial verificada entre o elétrodo de referência e o elétrodo de medição é utilizada no cálculo da concentração do ião em solução.<sup>3</sup>

O equipamento utilizado na secção de bioquímica é composto por um multisensor. Este é constituído por três sensores seletivos para os iões a determinar, e por um sensor de referência. A amostra é colocada no sensor e os iões estabelecem um equilíbrio com a superfície do elétrodo. O potencial elétrico resultante é comparado ao produzido na solução padrão, sendo obtida a concentração iónica.<sup>79</sup>

## Avaliação da Função Hepática

O fígado é o maior e mais complexo órgão do trato gastrointestinal. Localiza-se no quadrante superior direito do abdômen tendo como unidade básica funcional o hepatócito. Estas células são responsáveis pelas reações metabólicas, síntese macromolecular, e degradação e síntese de xenobióticos. Para além disso, o fígado é composto pelo sistema biliar, envolvido no metabolismo da bilirrubina e dos ácidos biliares, e pelo sistema reticuloendotelial, responsável pela produção do grupo heme e dos metabolitos globínicos. <sup>78</sup>

Os testes de avaliação da função hepática consistem na medição de componentes do sangue que providenciam informação acerca da existência, extensão e tipo de lesão hepática. Alterações em parâmetros bioquímicos como as proteínas totais, bilirrubina e aminotransferases refletem patologias a nível hepatocelular, colestase e das funções excretora e de síntese. <sup>38</sup>

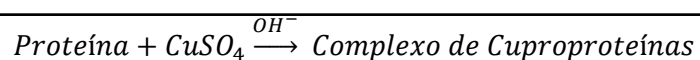
### Síntese Hepática

#### Proteínas Totais

Cada função celular depende de proteínas, desde a catalisação de reações bioquímicas por ação de enzimas até ao transporte de componentes pelos fluidos biológicos. A maioria das proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e secretadas pelo hepatócito na circulação.<sup>3</sup>

Alterações na concentração das proteínas totais são comuns e indicam, muitas das vezes, a presença de patologia do fígado que afeta a síntese destes compostos. Concentrações elevadas de proteínas podem indicar a presença de uma paraproteína, enquanto, baixas concentrações indicam que a albumina se encontra diminuída. <sup>62</sup>

A medição da concentração das proteínas totais em solução é realizada através da utilização de um método colorimétrico denominado de método do Biureto. Nesta ensaio, os iões cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) complexam com os grupos envolvidos na ligação peptídica. Em meio alcalino e na presença de, pelo menos, duas ligações peptídicas é formado um quelato de cor violeta. A solução teste é medida por espectrofotometria. <sup>38</sup>



**Equação 8.** Equação da reação que ocorre entre os iões cúpricos e as ligações peptídicas das proteínas, para obtenção da concentração de proteínas totais presentes em amostra. <sup>80</sup>

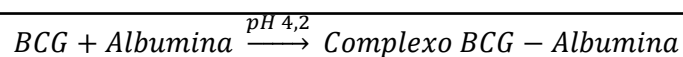
## Albumina

Como referido anteriormente, a Albumina é a principal proteína plasmática sendo sintetizada e secretada pelo fígado. Esta proteína é determinante na manutenção da pressão oncótica no espaço vascular. Para além disso, tem a capacidade de se ligar a várias substâncias que circulam no sangue como, por exemplo, hormonas da tiroide e ferro. <sup>3,74</sup>

A Albumina em concentrações elevadas pode dever-se a problemas de hidratação do doente ou na colheita da amostra. A diminuição desta proteína em circulação pode ter origem em diversas situações e, quando em concentrações bastante baixas, leva ao surgimento de edema. <sup>62,74</sup>

O fígado é o órgão que tem a capacidade sintética de manter a concentração de albumina em níveis normais. No entanto, na presença de doença hepática os níveis de albumina decrescem, nomeadamente, em casos de destruição massiva do tecido hepático como na cirrose secundária ao alcoolismo. A diminuição desta proteína ocorre, paralelamente, ao decréscimo das proteínas totais. <sup>74,78</sup>

Os métodos mais utilizados na determinação da albumina são procedimentos de ligação a corantes, que dependem da alteração do espectro de absorção aquando da ligação da albumina ao verde de bromocresol (BCG), por exemplo. O pH da solução é ajustado de modo que a albumina apresente uma carga positiva. A proteína em estudo é atraída e liga-se ao corante aniónico através de forças eletrostáticas. Quando o corante se encontra ligado à albumina, o máximo de absorção é diferente de quando se encontra livre. A concentração de albumina em solução é medida através da absorção do complexo albumina-corante. <sup>3,74</sup>



**Equação 9.** Equação da reação entre uma solução de verde de bromocresol (BCG) e a albumina em amostras de soro ou plasma para obtenção da concentração de albumina. <sup>81</sup>

## Função Excretora

### Bilirrubina Total e Conjugada

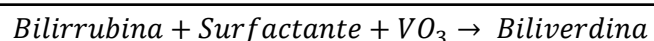
Uma das mais importantes funções do fígado é o processamento e excreção de substâncias endógenas e exógenas na bÍlis ou urina tal como o maior produto de excreção do heme, a bilirrubina. A bilirrubina é o principal pigmento biliar derivando da fagocitose dos eritrócitos. A porção heme da hemoglobina é convertida em bilirrubina que se liga à albumina, originando a bilirrubina indireta ou não conjugada. Esta forma é transportada para o fígado onde é conjugada pelas células hepáticas, denominando-se de bilirrubina direta ou conjugada. <sup>3,38</sup>

Um aumento da concentração de bilirrubina no sangue indica a presença de Icterícia. A Icterícia é a condição que ocorre quando a concentração sérica de bilirrubina é maior do que o normal e, por consequência, ocorre acumulação nos tecidos. Quando existe acumulação deste pigmento biliar, a pele, esclera e membranas mucosas evidenciam uma pigmentação amarelada. <sup>38</sup>

As Hiperbilirrubinémias podem resultar de diversos síndromes hereditários que alteram o metabolismo da bilirrubina como os Síndromes de Crigler-Najjar, de Gilbert e Dubin-Johnson. Para além disso, a Icterícia do Recém-Nascido é uma condição bastante comum. <sup>74</sup>

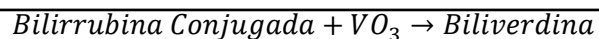
O ensaio utilizado para determinação das Bilirrubinas Total e Direta baseia-se num método de oxidação química que recorre ao ácido vanadato como agente oxidante. <sup>82</sup>

Para determinação da concentração de Bilirrubina Total, a bilirrubina em solução é oxidada pelo vanadato a um pH de 2,9 de modo a produzir biliverdina. Na presença de um detergente e do ácido vanadato, as bilirrubinas direta e indireta são oxidadas. Ocorre, por isso, uma redução na densidade ótica da cor amarela, característica do parâmetro em análise. A redução na densidade ótica é proporcional à concentração de Bilirrubina Total na amostra. <sup>82</sup>



**Equação 10.** Equação da reação entre o ácido vanadato e a bilirrubina para determinação da concentração de bilirrubina total. <sup>82</sup>

A Bilirrubina Direta ou Conjugada é determinada de forma semelhante à Bilirrubina Total. No entanto, na presença do detergente e vanadato somente a bilirrubina direta é oxidada. A redução na densidade ótica a 451/545 nm é proporcional à concentração de Bilirrubina Direta na amostra. <sup>83</sup>



**Equação 11.** Equação da reação entre o ácido vanadato e a bilirrubina para determinação da concentração de bilirrubina direta. <sup>83</sup>

## Enzimas

Os hepatócitos contêm elevados níveis de diversas enzimas. No caso de lesão hepática, estas enzimas podem passar para o plasma e serem úteis no diagnóstico e monitorização da patologia. Devido ao facto de a função hepática ser normal em diversos doentes, a medição da atividade plasmática de algumas enzimas é indicadora de doença hepática. O conhecimento da localização celular das enzimas e das mudanças dos padrões enzimáticos é deveras importante para a elaboração de um diagnóstico. <sup>74,78</sup>

As enzimas mais utilizadas no diagnóstico de patologias hepáticas são a Aspartato Amino-Transferase (AST), Alanina Amino-Transferase (ALT), Lactato Desidrogenase (LDH), Fosfatase Alcalina (ALP) e  $\gamma$ -Glutamilttransferase (GGT).

Aquando de uma lesão hepatocelular, as enzimas presentes nos hepatócitos são libertadas como resultado de danos na membrana celular que provocam, diretamente, a extrusão do conteúdo citosólico. As enzimas que se situam no citoplasma são a ALT, LDH e AST, que se localiza também a nível mitocondrial. As enzimas ALP e GGT são, sobretudo, enzimas canaliculares sendo marcadores de disfunção biliar. <sup>78</sup>

## Relatório de Estágio – Mariana Teles

**Tabela 5.** Enzimas utilizadas no diagnóstico de patologia hepática.

Enzimas	Função	Distribuição	Equação da reação de determinação
<b>Aspartato Amino-Transferase (AST)</b>	Transferência de um grupo amina entre o aspartato e $\alpha$ -cetoácidos.	Tecido cardíaco, fígado e músculo esquelético.	$L\text{-Aspartato} + \alpha\text{-Cetoglutarato} \xrightarrow{AST} \text{Oxalacetato} + L\text{-Glutamato}$ $\text{Oxalacetato} + NADH \xrightarrow{\text{Malato Desidrogenase}} \text{Malato} + NAD$
<b>Alanina Amino-Transferase (ALT)</b>	Catalisa a transferência de um grupo amina da alanina para o $\alpha$ -cetoglutarato com a formação de glutamato e piruvato.	É no fígado que se encontra em maior concentração.	$L\text{-Alanina} + \alpha\text{-Cetoglutarato} \xrightarrow{ALT} \text{Piruvato} + L\text{-Glutamato}$ $\text{Piruvato} + NADH \xrightarrow{\text{Lactato Desidrogenase}} \text{Lactato} + NAD$
<b>Lactato Desidrogenase (LDH)</b>	Catalisa a interconversão dos ácidos láctico e pirúvico.	Coração, fígado, músculo esquelético, rim, eritrócitos.	$L\text{-lactato} + NAD + H^+ \xrightarrow{LDH} \text{Piruvato} + NADH^+$
<b>Fosfatase Alcalina (ALP)</b>	Catalisa a hidrólise de diversos fosfomonoésteres a um pH alcalino.	Intestino, fígado, osso, baço, placenta, rim.	$\rho\text{-NPP} + AMP \xrightarrow[\text{pH } 10,25 \text{ Mg/Zn}]{ALP} \rho\text{-NP} + AMP + PO_4$
<b><math>\gamma</math>-Glutamilttransferase (GGT)</b>	Transporte de aminoácidos pelas membranas celulares. Catalisa a transferência de um grupo glutamilo do glutatião para um aminoácido livre.	Rim, cérebro, próstata, pâncreas, fígado.	$L\text{-}\gamma\text{-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida} + \text{Glicilglicina} \xrightarrow{GGT} 5\text{-amino-2-nitrobenzoato} + L\text{-}\gamma\text{-glutamil-glicilglicina}$

## **Avaliação do Risco Cardiovascular**

O coração é o principal órgão do corpo humano tendo como função bombear o sangue até aos outros órgãos de modo entregar oxigénio e nutrientes e remover os resíduos dos tecidos.<sup>3</sup> É um órgão que está sujeito a uma imensa pressão o que significa que está sujeito ao surgimento de diversas patologias.

A etiologia da doença cardiovascular (DCV) é multifatorial, podendo estar relacionada com os hábitos de vida, como tabagismo, falta de atividade física e dieta. Para além disso, pode dever-se a hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemias, todos fatores modificáveis.<sup>84</sup>

Os testes laboratoriais apresentam um papel bastante significativo na prevenção, diagnóstico e monitorização da doença coronária. O rastreio de fatores de risco, onde se inclui o perfil lipídico, é aconselhado em homens com mais de quarenta anos e em mulheres com mais de cinquenta anos, tendo em atenção a presença de outros fatores de risco. Do mesmo modo, indivíduos com aterosclerose, diabetes tipo 2 e com historial familiar de DCV devem ser avaliados.<sup>84</sup>

### **Lípidos e Lipoproteínas**

O metabolismo lipídico pode ser perturbado levando a alterações na função e/ou níveis das lipoproteínas plasmáticas. Estas alterações em conjunto com outros fatores de risco cardiovasculares podem contribuir para o surgimento de Aterosclerose, uma patologia onde ocorre acumulação de gordura, colesterol e outras substâncias nas paredes arteriais formando placas ateroscleróticas.<sup>74,84</sup>

As Dislipidemias são patologias provocadas por concentrações lipídicas anómalas, que podem dever-se a anomalias genéticas ou a desequilíbrios no estilo de vida. São exemplo a Hiperlipoproteinemia e Hipercolesterolemia.<sup>3</sup>

A avaliação do perfil lipídico é feita com base nos valores de Colesterol total, Triglicéridos, Colesterol-HDL (*High-density Lipoproteins*) e Colesterol-LDL (*Low-density Lipoproteins*), calculado pela fórmula de Friedewald caso os Triglicéridos não sejam superiores a 400 mg/dL ou 4,5 mmol/L. Em alternativa, podem ser utilizadas a Apo B e Apo A-1 que são tão bons marcadores de risco como os parâmetros clássicos.<sup>84</sup>

## Colesterol Total

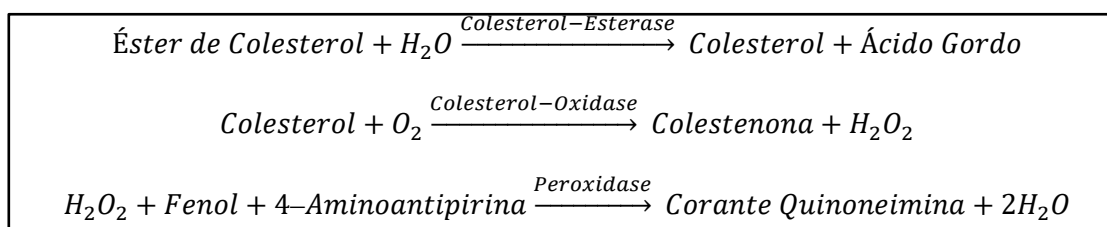
O colesterol é utilizado pelo organismo para facilitar o transporte de triglicéridos pelas lipoproteínas, para manter a estrutura normal e integridade da membrana celular, sendo também um precursor da síntese da hormona esteroide. <sup>3</sup>

Os níveis de Colesterol são determinados pelo metabolismo lipídico, que sofre influência de fatores hereditários, dieta, fígado, rins, tireoide e outros órgãos com funções endócrinas. <sup>8</sup>

Níveis elevados de Colesterol podem dever-se a distúrbios primários como a Hipercolesterolemia poligénica, e a distúrbios secundários como Diabetes Mellitus e Hipotireoidismo. Apresenta-se diminuído em situações que afetem o fígado como na Cirrose, em casos de Hipertireoidismo e de queimaduras extensivas. <sup>8</sup>

O Colesterol Total, juntamente com o Colesterol-LDL, é um dos principais parâmetros de risco cardiovascular. <sup>84</sup>

Os ensaios para determinação dos níveis de colesterol presentes numa amostra baseiam-se, sobretudo, em reações enzimáticas.



**Equação 12.** Equações das reações enzimáticas que se realizam para determinar a quantidade de Colesterol Total na amostra. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol-esterase em colesterol livre e ácidos gordos. O colesterol livre origina colesteno e peróxido de hidrogénio na presença da colesterol-oxidase. O peróxido de hidrogénio produz, sob influência da peroxidase, um composto colorido que é proporcional à quantidade do analito em solução. <sup>3,85</sup>

## Triglicéridos

Os Triglicéridos são os ésteres de glicerol predominantes no plasma. Podem ter origem endógena, onde são produzidos no fígado, e origem exógena, com origem na dieta. <sup>8,74</sup>

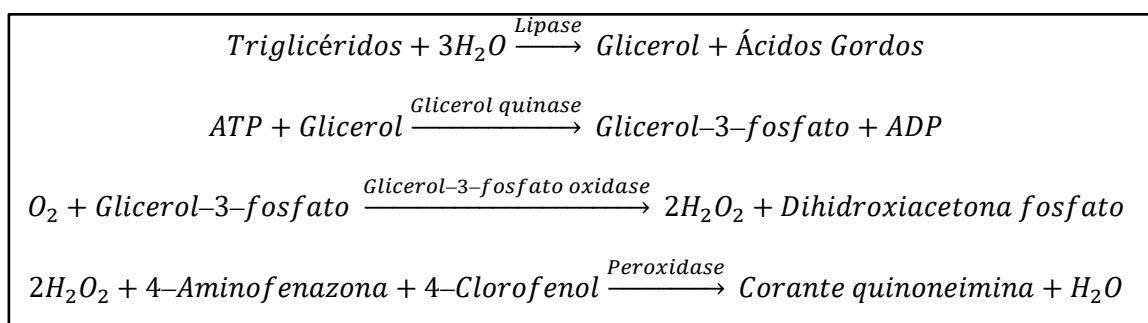
Os Triglicéridos com origem na dieta são digeridos no intestino e, através da ação das lipases pancreática e intestinal na presença de ácidos biliares, são hidrolisados em glicerol, monoglicéridos e ácidos gordos. Após a absorção, todos os componentes são juntos, novamente, nas células epiteliais intestinais. Em conjunto com colesterol e a Apo B-48 formam as Quilomicras, lipoproteínas que serão libertadas no fígado e células

periféricas. Os triglicéridos endógenos são transportados pelas VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*).<sup>8,74</sup>

A determinação destes lípidos é bastante importante no diagnóstico de Hiperlipidemias. Tanto as Quilomicras como as VLDL são partículas leves que flutuam no plasma, refletindo a luz e aumentando a turbidez de amostras hiperlipidémicas. Apenas as Quilomicras formam uma camada cremosa no topo do plasma que evidencia a sua presença.<sup>3</sup>

Os níveis de triglicéridos encontram-se aumentados no Hipotireoidismo, Diabetes Mellitus, Alcoolismo Crónico e Obesidade. O oposto verifica-se na Doença de Tangier, Hipertireoidismo, Má nutrição e Má absorção.<sup>8</sup>

A medição dos triglicéridos séricos em conjunto com o colesterol é útil na deteção de distúrbios metabólicos assim como na caracterização de doentes de risco de doença cardiovascular.<sup>3</sup>



**Equação 13.** Equações das reações enzimáticas que decorrem no doseamento dos triglicéridos presentes numa amostra. Os triglicéridos presentes são convertidos em glicerol livre e ácidos gordos pela lipase. O glicerol gerado é convertido a glicerol-3-fosfato pela glicerol quinase e em peróxido de hidrogénio, pela ação da glicerol-3-oxidase. O peróxido de hidrogénio, a 4-aminofenazona e 4-clorofenol originam um composto colorido que é proporcional à quantidade de triglicéridos presentes.

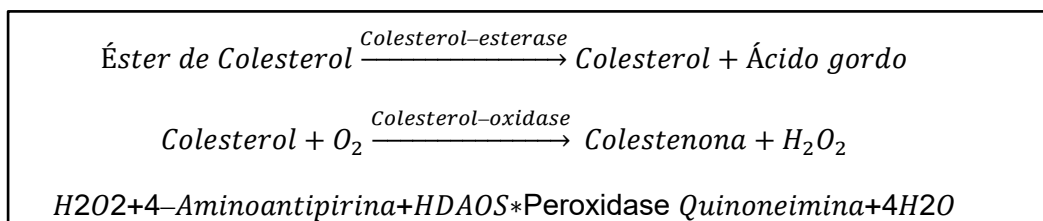
<sup>86</sup>

### Colesterol HDL

As HDL são pequenas partículas constituídas por proteínas, colesterol e fosfolípidos, apenas com alguns triglicéridos. São constituídas, sobretudo, pela apolipoproteína Apo A-1. A sua síntese decorre no fígado e no intestino, estando envolvida no mecanismo de transporte reverso do colesterol. A sua principal função é remover o colesterol em excesso das células periféricas e transportá-lo para o fígado.<sup>3,78</sup>

O colesterol transportado pelas HDL em baixas concentrações está relacionado com o risco de desenvolvimento de DCV sendo por isso considerado um colesterol protetor quando aumentado. É denominado de “Colesterol Bom”.<sup>87</sup>

O método de quantificação do colesterol HDL utilizado é um método de precipitação onde são aplicados dois reagentes. O primeiro reagente é adicionado para eliminar todas as lipoproteínas não HDL e o segundo, composto por enzimas, para quantificar o colesterol HDL. <sup>3</sup>



**Equação 14.** Equações da reação de quantificação do colesterol HDL presente numa amostra. Numa primeira reação, são eliminadas as outras lipoproteínas presentes por ação da colesterol-esterase e colesterol-oxidase. O peróxido de hidrogénio produzido pela oxidase é eliminado pela catalase. Na segunda fase do doseamento, é medido o colesterol HDL após a sua libertação pelo surfactante do reagente dois. A catalase do passo um é inibida por azida sódica no reagente dois. A intensidade da quinoneimina produzida na reação é diretamente proporcional à concentração de colesterol a um comprimento de onda de 596/694 nm. <sup>88</sup>

\* HDAOS= N-(2-hidroxi-3-sulfopropil) -3,5-dimetoxianilina

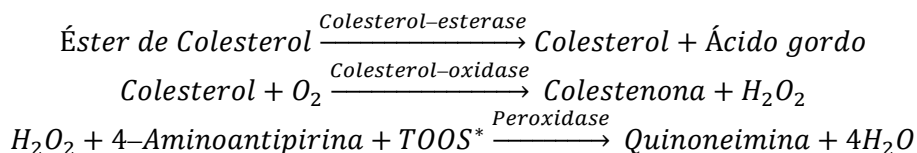
### Colesterol LDL

As LDL são lipoproteínas ricas em colesterol e compostas pela apolipoproteína Apo B-100. São formadas a partir da lipólise das VLDL. As LDL são bastante pequenas tendo a capacidade de se infiltrarem no espaço extracelular das paredes dos vasos. Após a infiltração, são oxidados e absorvidos pelos macrófagos que, ao consumirem muitos lípidos, se transformam em células esponjosas precursoras das placas ateroscleróticas. A sua principal função é então transportar colesterol até às células periféricas e fígado. Em conjunto com o colesterol total, é um dos principais parâmetros de risco cardiovascular, estando associado a situações de Hipercolesterolemia. <sup>3</sup>

O Colesterol LDL pode ser determinado através de metodologia direta e indireta. A metodologia indireta consiste no cálculo do seu valor através da fórmula de Friedewald onde estão os doseamentos do colesterol Total, colesterol HDL e triglicéridos, que representam as VLDL. Esta equação só é utilizada quando os valores dos triglicéridos não se encontram muito elevados, ou seja, superiores a 400 mg/dL. Para além disso, não deve ser utilizada em amostras com quantidades significativas de quilomicras. <sup>74,84</sup>

$$\text{Colesterol LDL} = [\text{Colesterol Total}] - [\text{Colesterol HDL}] - [\text{Triglicéridos}]/5$$

**Equação 15.** Equação de Friedewald utilizada na determinação do colesterol LDL. <sup>74</sup>



**Equação 16.** Equações da reação de quantificação do Colesterol LDL presente numa amostra. Numa primeira reação, as enzimas colesterol-esterase e colesterol-oxidase eliminam o colesterol associado a outras lipoproteínas. A ação da catalase elimina o peróxido de hidrogénio produzido. O doseamento do colesterol LDL é conseguido através da libertação do mesmo por ação do detergente presente no reagente nº2. A catalase da primeira reação é inibida pela azida de sódio presente no reagente. A intensidade da quinoneimina produzida na reação de Trinder é diretamente proporcional à concentração de colesterol a um comprimento de onda de 596/694 nm. <sup>89</sup>

\* TOOS= N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil) -3-metilanilina

### Apolipoproteínas

Os lípidos são, por natureza, insolúveis no ambiente aquoso da circulação. As apolipoproteínas são constituintes proteicos que auxiliam na solubilidade e que apresentam também outras funções. São doseadas por serem consideradas tão bons marcadores de risco cardíaco como os parâmetros lipídicos convencionais. <sup>3,84</sup>

As apolipoproteínas mais utilizadas são a Apo A-I e a Apo B, devido à sua capacidade discriminatória em relação à patologia aterosclerótica. A Apo A-I encontra-se nas HDL, enquanto a Apo B existe nas LDL, VLDL e quilomicras. <sup>3,78</sup>

Estes componentes proteicos das lipoproteínas são considerados marcadores únicos na identificação e diferenciação das mesmas, podendo informar sobre a sua integridade estrutural e especificidade funcional. A medição das Apo A-I e Apo B em indivíduos com alterações ateroscleróticas significativas demonstra níveis de apolipoproteínas bastante aumentados, comparando com indivíduos com valores normais. A determinação de ambas é bastante mais eficaz na identificação de indivíduos de risco do que o seu doseamento individual. <sup>90,91</sup>

O ensaio para determinação das Apo A-I e Apo B é um ensaio turbidimétrico reforçado por polietilenoglicol. Se a amostra contiver uma das apolipoproteínas e um antissoro específico, é formado um composto insolúvel que é medido por turbidimetria a 340/694 nm. Por fim, constrói-se uma curva de calibração a partir das absorvâncias de padrões que auxilia na determinação da concentração da apolipoproteína em análise. <sup>90,91</sup>

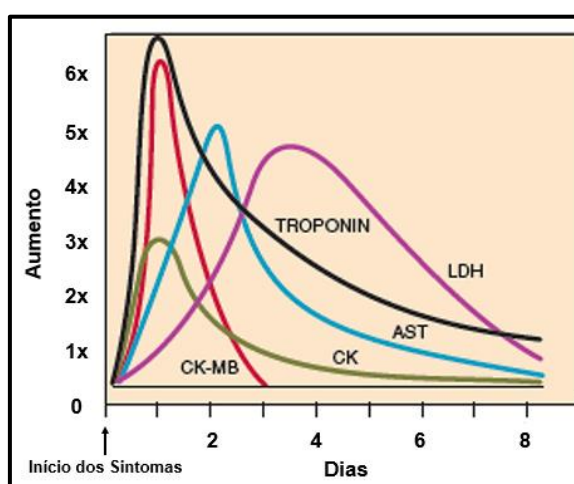
## Marcadores Cardíacos

A Doença Isquêmica Aguda e a falha cardíaca são duas patologias cardiovasculares que requerem um diagnóstico bioquímico. O Enfarte Agudo do Miocárdio é uma doença isquêmica que ocorre devido ao desequilíbrio entre a entrega e o fornecimento de oxigênio no miocárdio, resultando em dano e eventual morte dos miócitos.<sup>74</sup>

O diagnóstico destas patologias tem por base o doseamento de marcadores cardíacos. Estes marcadores devem apresentar características específicas que permitam distinguir entre doença cardíaca e outros tipos de doenças, tais como elevada especificidade para o dano miocárdico na presença de dano no músculo esquelético, alta sensibilidade para detetar danos cardíacos mínimos e a capacidade de monitorizar o prognóstico e terapia.

3

São utilizados diversos biomarcadores cardíacos, na sua maioria proteínas presentes no miocárdio que diferem na sua localização no miócito, na cinética de libertação após dano celular e a sua presença na circulação sanguínea. Alguns deles são enzimas, como a creatina quinase (CK) e a sua isoenzima CK-MB, a AST e LDH. Não é recomendada a determinação das duas últimas devido à sua presença em outros órgãos e respetivas patologias, como é o caso da patologia hepática onde estas duas enzimas apresentam um papel importante de diagnóstico. Para além destas, são utilizadas proteínas cardíacas como a mioglobina e as troponinas I e T.<sup>3</sup>



**Figura 38.** Enzimas e proteínas cardíacas no soro após um enfarte agudo do miocárdio.

(Adaptado de: "Clinical Biochemistry- An Illustrated Colour Text", 5ª Edição, 2013)

## Relatório de Estágio – Mariana Teles

**Tabela 6.** Marcadores cardíacos utilizados no diagnóstico de enfarte do miocárdio.

Marcadores Cardíacos	Descrição	Variação após enfarte	Princípio Analítico
<b>Mioglobina</b>	Proteína heme de ligação ao oxigênio presente nos músculos cardíaco e esquelético. Utilizada no diagnóstico da doença isquêmica aguda faltando-lhe, no entanto, especificidade. <sup>3</sup>	A sua concentração aumenta nas primeiras quatro horas após o início dos sintomas. Retorna a valores normais após dezoito a vinte e quatro horas. <sup>3</sup>	É utilizado um imunoenensaio quimiluminescente direto com recurso a dois anticorpos (anticorpo anti mioglobina policlonal de cabra marcado com um éster de acridina e um anticorpo anti mioglobina monoclonal de rato ligado a partículas paramagnéticas). <sup>92</sup>
<b>Troponinas (C, I e T)</b>	Complexo de três subunidades proteicas, as troponinas C, I e T. A sua principal função é a ligação ao cálcio e regulação da contração muscular. Apresentam elevada sensibilidade e especificidade para o dano miocárdico. As troponinas T (cTNT) e I (cTNI) são as isoformas mais relevantes no diagnóstico e monitorização de enfarte do miocárdio. Contudo, a cTNI é expressa apenas no músculo cardíaco permitindo a diferenciação entre dano no miocárdio e no músculo esquelético. <sup>3,8,74</sup>	A sua concentração aumenta entre quatro e dez horas após o início dos sintomas, atingindo o pico entre as doze e quarenta e oito horas, permanecendo elevadas até cerca de dez dias. <sup>3</sup>	É utilizado um imunoenensaio em sanduíche em três locais onde é utilizada tecnologia quimioluminométrica direta. <sup>93</sup>
<b>Creatina Quinase (CK)</b>	Enzima que catalisa reversivelmente a reação entre a creatina e o trifosfato de adenosina (ATP) para produzir creatina fosfato e difosfato de adenosina (ADP). Amplamente distribuída nos tecidos, verificando-se maior atividade nos músculos esquelético e cardíaco, e tecido cerebral. A isoenzima mais utilizada é a CK-MB. <sup>3,8</sup>	Durante um enfarte, os níveis séricos de CK aumentam rapidamente persistindo durante dois a três dias após o episódio. No entanto, não é inteiramente específico de patologia cardíaca. Os níveis de CK-MB aumentam entre quatro a oito horas, atingindo o pico entre as doze e vinte e quatro horas, retomando a valores normais após três dias. <sup>3,8</sup>	$\text{Creatina Fosfato} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CK, Mg}^{2+}} \text{Creatina} + \text{ATP}$ $\text{D-Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK, Mg}^{2+}} \text{ADP} + \text{G6P}$ $\text{G6P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6PD}} \text{6-Fosfoglucono-}\delta\text{-Lactona} + \text{NADPH}$

## Avaliação do Doente Diabético

A Diabetes Mellitus é a doença mais comum do metabolismo dos carboidratos, onde ocorre hiperglicemia devido a defeitos na secreção da insulina ou resistência à mesma. Pode subdividir-se em Tipo 1 e Tipo 2, podendo existir também outros tipos como a diabetes gestacional. A diabetes tipo 1 resulta da destruição das células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans do pâncreas, verificando-se insulinopenia absoluta e necessidade de insulino-terapia para sobreviver. A diabetes tipo 2 está, muitas vezes, associada a obesidade, hipertensão arterial e a dislipidemia, existindo uma insulinopenia relativa.

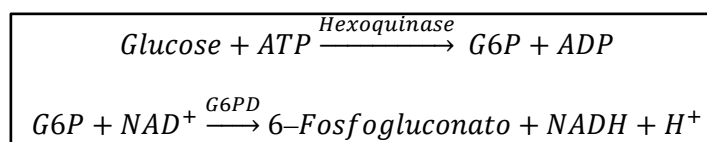
3,62,94

O diagnóstico desta patologia tem por base critérios como a glicemia em jejum, glicemia às duas horas de prova de tolerância à glucose oral (PTGO) e hemoglobina glicada. O diagnóstico laboratorial avalia a concentração de glucose em circulação, os níveis de insulina e outros parâmetros como a frutossamina, glicosúria e presença de corpos cetônicos.<sup>62,94</sup>

### Glucose

A glucose pode ser medida a partir de soro, plasma ou do sangue total. Os métodos mais comumente utilizados são métodos enzimáticos onde se recorre à glucose oxidase ou glucose hexoquinase. O método da hexoquinase é considerado mais preciso do que o anteriormente referido, devido à elevada especificidade da glucose-6-fosfato desidrogenase.<sup>3</sup>

A hexoquinase na presença de ATP converte a glucose em glucose-6-fosfato. Este composto conjuntamente com o NADP<sup>+</sup> é convertido em 6-fosfogluconato e NADPH pela ação da glucose-6-fosfato desidrogenase. O NADPH apresenta absorvância máxima a 340 nm, sendo diretamente proporcional à glucose presente na amostra.<sup>3</sup>



**Equação 17.** Equações das reações de determinação da atividade enzimática da glucose hexoquinase. A glucose é fosforilada pelo ATP na presença de hexoquinase, originando glucose-6-fosfato. A G6P é oxidada pela enzima glucose-6-fosfato desidrogenase provocando a redução do NAD oxidado em NADH. A absorvância de NADH é medida a 340/410 nm, sendo proporcional à concentração de glucose.<sup>95</sup>

### **Insulina**

A insulina é uma hormona peptídica secretada pelas células beta que compõem os ilhéus de Langerhans do pâncreas. É responsável pela regulação da concentração de glucose no sangue. Surge doença quando as concentrações de insulina são inapropriadas para determinados níveis de glucose no sangue. A deficiência em insulina, seja absoluta ou relativa, origina Diabetes Mellitus. <sup>78,96</sup>

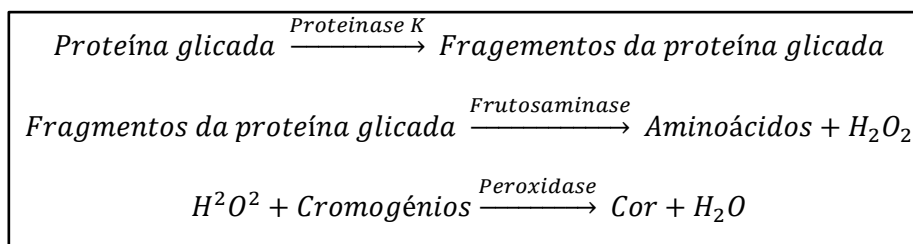
A medição da insulina é utilizada, sobretudo, na avaliação de doentes com hipoglicémia. No entanto, a sua determinação pode também ser útil na avaliação da resistência à insulina e da sua secreção, sendo também vantajosa na definição da terapia inicial em doentes com Diabetes do tipo 2. <sup>74</sup>

Na determinação dos níveis de insulina é utilizado um imunoensaio sanduíche em dois locais que recorre à tecnologia quimiluminescente direta, onde são utilizados dois anticorpos. O primeiro anticorpo é um anticorpo anti-insulina monoclonal de rato marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo é um anticorpo anti-insulina monoclonal de rato ligado covalentemente a partículas paramagnéticas. <sup>96</sup>

### **Frutosamina**

A frutosamina é resultado da glicação da albumina, referindo-se às proteínas plasmáticas cetoaminas. Em alguns doentes diabéticos, são necessários métodos mais sensíveis do que a HbA1c para evidenciar alterações na concentração de glucose no sangue. Devido ao facto de as proteínas séricas terem um tempo de semivida mais curto do que os eritrócitos, a concentração sérica de albumina glicada reflete os níveis de glucose durante um período de duas a três semanas. <sup>74</sup>

A determinação da frutosamina é vantajosa pela utilização de amostras de soro e equipamentos automáticos, o que permite uma execução simples e barata. No entanto, estes métodos podem ser afetados por alterações nas proteínas séricas como as que se verificam nas doenças agudas ou hepáticas. <sup>78</sup>



**Equação 18.** Equações das reações de determinação da frutossamina. As proteínas glicadas são digeridas em fragmentos por ação da proteinase K. A frutosaminase oxida a ligação cetoamina dos fragmentos de proteínas glicadas, libertando peróxido de hidrogénio. A reação que ocorre é uma reação colorimétrica que origina cor. A quantidade de cor é medida a 596/694 nm sendo proporcional à concentração de proteína glicada. <sup>97</sup>

## Avaliação do Metabolismo do Ferro

O ferro é um elemento essencial ao ser humano encontrando-se distribuído pelo organismo nas mais diversas formas. A ferritina e hemossiderina constituem as formas de armazenamento do referido ião, situando-se as suas reservas no fígado, baço, medula óssea e músculo. Os hepatócitos são o principal local de reserva, tendo como função retirá-lo da circulação protegendo o organismo de radicais de oxigénio tóxicos. A absorção deste ião, proveniente da dieta, a partir do intestino é a principal forma da regulação da homeostase do ferro no organismo humano. <sup>98</sup>

A maioria do ferro funcional circula nos eritrócitos ligado ao grupo heme da hemoglobina. Apenas uma pequena fração do ferro total do organismo circula no plasma e fluidos extracelulares encontrando-se ligado à proteína transportadora de ferro, a transferrina. Esta glicoproteína, para além de transportar o ferro, tem como principal função a prevenção da sua perda através do rim. <sup>3,98</sup>

A deficiência em ferro ou sobrecarga são os maiores distúrbios do metabolismo férrico.

A Hemossiderose é a condição originada pela sobrecarga de ferro no organismo, conduzindo à sua deposição nos tecidos. Se o excesso do referido ião levar ao dano dos tecidos onde se acumula, evolui para a condição de Hemocromatose. Esta condição pode ser hereditária ou adquirida, através do aumento da ingestão ou libertação do ferro presente nos eritrócitos. <sup>3,74,78</sup>

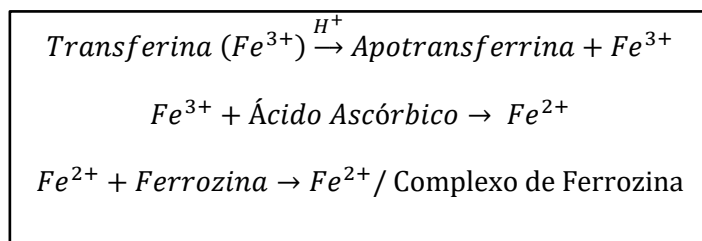
A anemia ferropénica é uma condição bastante comum de deficiência em ferro. A anemia desenvolve-se quando a ingestão de ferro é inadequada, quando existe um aumento da sua necessidade sem compensação da ingestão ou quando ocorrem perdas significativas de hemoglobina. <sup>4</sup>

Os distúrbios referentes ao metabolismo férrico podem ser diagnosticados através da medição do ferro sérico, da capacidade total de fixação do ferro, ferritina e transferrina séricas.

### **Ferro Sérico**

A concentração sérica de ferro é determinada pela absorção que ocorre no intestino, pelo armazenamento em diversos órgãos e pela taxa de síntese ou perda de hemoglobina. <sup>8</sup>

O ferro sérico pode ser determinado por métodos colorimétricos onde o ferro é libertado da transferrina pelo decréscimo do pH sérico. É reduzido de ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) a ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) sendo complexado com um cromogénio, tal como a batofenantroína ou ferrozina. O complexo ferro-cromogénio originado, apresenta uma absorvância extremamente elevada a um comprimento de onda aplicável, sendo diretamente proporcional à concentração de ferro em solução. <sup>74</sup>



**Equação 19.** Equações da reação de determinação da concentração de ferro sérico. O ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) é separado da transferrina, sendo reduzido a ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ). A formada reduzida do ião obtida é complexada com ferrozina, produzindo um cromóforo cuja absorvância se situa entre os 571 e os 678 nm. A absorvância medida é diretamente proporcional à concentração de ferro em solução. <sup>99</sup>

### **Ferritina**

A ferritina é uma proteína que se encontra presente em todas as células do corpo, armazenando o ferro presente nos fluidos biológicos prevenindo a ocorrência de danos oxidativos. Esta proteína nos hepatócitos e macrófagos fornece uma reserva de ferro disponível para a síntese da hemoglobina e outras proteínas heme. <sup>74</sup>

Para além da sua função de armazenamento, é também uma proteína de fase aguda produzida no fígado durante a fase aguda da inflamação. Isto significa que os níveis séricos de ferritina podem encontrar-se aumentados devido à presença de uma infeção e não de uma deficiência em ferro. O valor preditivo deste parâmetro analítico é fraco nestas situações, sendo elevado para a deficiência férrica apenas quando se verifica um decréscimo do ferro armazenado o que diminui os níveis de ferritina. <sup>4</sup>

Os níveis séricos de ferritina podem ser medidos através de métodos imunoquímicos como a técnica de ELISA.

### **Transferrina e Capacidade Total de Fixação do Ferro**

A transferrina é a maior proteína plasmática de transporte do ferro. É sintetizada no fígado, sendo a sua síntese regulada pelas reservas de ferro disponíveis no organismo. Quando os níveis de ferro no hepatócito estão baixos ou ausentes, ocorre um aumento dos níveis de transferrina em proporção à deficiência. É, por isso, um indicador precoce de deficiência férrica.<sup>3,8</sup>

O parâmetro referido pode ser medido diretamente através de metodologia imunoquímica ou indiretamente pela capacidade total de fixação do ferro (TIBC).<sup>62</sup>

A TIBC é uma estimativa dos níveis séricos de transferrina. A quantidade de ferro no plasma ou soro é limitada pela quantidade de transferrina disponível para o transportar. Para medir os níveis desta proteína transportadora, a mesma é saturada pela adição de ferro férrico em excesso à amostra. Qualquer íon de ferro que não esteja ligado à proteína é removido. É aplicado um método de determinação do ferro sérico total no soro absorvido, começando com a libertação do ferro da transferrina. A quantidade de ferro detetado representa todos os locais de ligação disponíveis na proteína, traduzindo-se na capacidade total de ligação do ferro.<sup>3,4</sup>

$$\text{Saturação de Transferrina (\%)} = \frac{100 \times \text{ferro sérico}}{\text{TIBC}}$$

**Equação 20.** Equação de obtenção da Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC).<sup>74</sup>

## **Avaliação da Função Pancreática**

O pâncreas é um órgão envolvido no processo digestivo, estando localizado fora do sistema gastrointestinal. É composto por dois tipos de tecidos morfológica e funcionalmente diferentes: o tecido endócrino e o tecido exócrino.<sup>3</sup>

As funções endócrinas do pâncreas incluem a produção de insulina e glucagon, ambas envolvidas no metabolismo dos carboidratos. A função exócrina envolve a produção de diversas enzimas que participam no processo digestivo. As referidas enzimas têm a capacidade de digerir proteínas, carboidratos e gorduras.<sup>3</sup>

Devido à sua localização no abdômen, as manifestações clínicas de patologias pancreáticas são inespecíficas, levando, muitas vezes, a um diagnóstico tardio. Existem alguns parâmetros analíticos que permitem detetar alterações funcionais no órgão, contribuindo para a elaboração de um diagnóstico. <sup>100</sup>

A pancreatite aguda é uma das doenças pancreáticas mais comuns. Consiste numa inflamação do pâncreas provocada pelo dano das células acinares, devido à ativação de enzimas digestivas dentro do parênquima pancreático. O diagnóstico clínico é realizado através da observação dos níveis séricos de duas enzimas produzidas pelo mesmo: a amilase e lipase. <sup>78</sup>

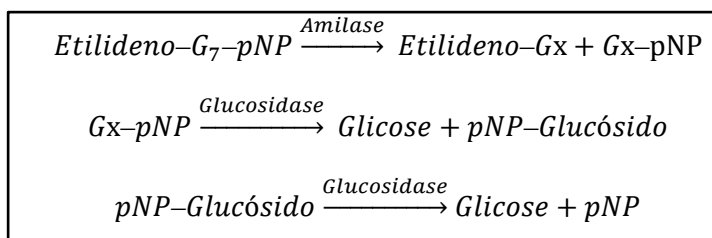
### **Amilase**

A amilase é uma enzima de baixo peso molecular produzida pelo pâncreas exócrino e pelas glândulas salivares, sendo a única enzima plasmática encontrada na urina. As isoenzimas predominantes no soro e urina são a pancreática e a salivar. <sup>74</sup>

A medição dos níveis séricos desta enzima é útil no diagnóstico da pancreatite aguda, em que a sua concentração aumenta em 75% dos doentes. No início da doença, a atividade da amilase aumenta atingindo um pico após vinte e quatro horas, retornando ao normal entre três a cinco dias devido à clearance dos rins. <sup>3</sup>

Contudo, patologias que ocorram noutros tecidos podem provocar elevações na concentração da amilase. Por essa razão, um aumento não é totalmente específico do pâncreas. A medição da isoenzima pancreática permite estabelecer um diagnóstico diferencial em doentes com dor abdominal aguda. <sup>3,74</sup>

O ensaio analítico utilizado na medição da atividade da amilase pancreática tem por base a inibição da isoforma salivar por anticorpos monoclonais. São incubados dois anticorpos monoclonais com a amostra de modo a inibir a amilase salivar presente, não afetando a atividade da isoenzima pancreática. É utilizado etilideno-p-nitrofenil-maltoheptósido como substrato. <sup>101</sup>

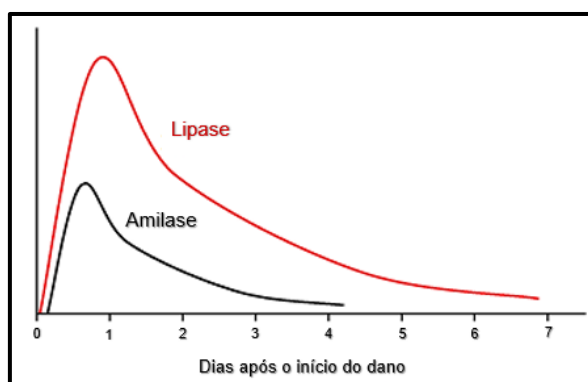


**Equação 21. Equações da determinação da atividade enzimática da Amilase Pancreática.** O substrato da reação enzimática é o etilideno-p-nitrofenil-maltoheptósido. A amilase pancreática divide o substrato originando oligossacarídeos e p-nitrofenol 2, 3 e 4. A glucosidase, enzima indicadora, liberta o p-Np que é detetado a 410/694 nm. Por fim, a glicose terminal é bloqueada impedindo a clivagem da glucosidase.<sup>101</sup>

## Lipase

A lipase é uma enzima que hidrolisa as ligações éster das gorduras para produzir álcool e ácidos gordos. É encontrada, principalmente, no pâncreas, podendo estar também presente no estômago e intestino.<sup>3</sup>

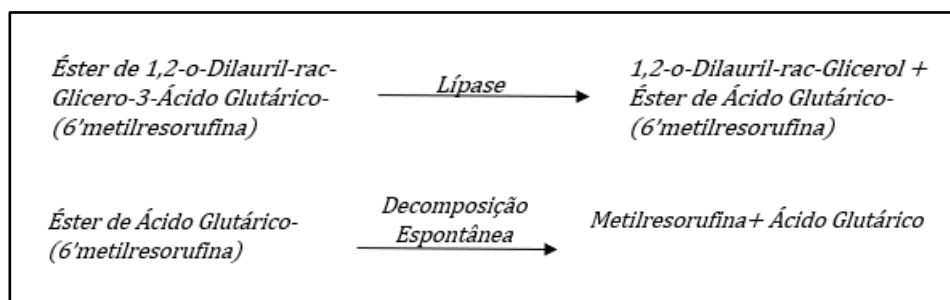
Os ensaios clínicos para medição da atividade enzimática da lipase são utilizados para diagnosticar a pancreatite aguda. A sua concentração sérica aumenta na mesma altura que a amilase permanecendo elevados, no entanto, por cinco dias enquanto os níveis de amilase permanecem cerca de três dias. Por essa razão, a lipase é considerada mais específica na deteção de patologia pancreática.<sup>3,8</sup>



**Figura 39.** Alterações dependentes do tempo na amilase e lipase séricas após pancreatite aguda.

(Adaptado de: "Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics", 2015)

O ensaio analítico de determinação da atividade enzimática da lipase baseia-se na produção de metilresorufina, determinada espectrofotometricamente.



**Equação 22.** Equações de determinação da atividade enzimática da Lipase. O substrato cromogénico da lipase é clivado pela ação da lipase originando 1,2-o-dilauril-rac-glicerol e um éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina), que se decompõe espontaneamente para formar ácido glutárico e metilresorufina. A atividade da lipase é diretamente proporcional à produção de metilresorufina, determinada a 571/694 nm. <sup>102</sup>

## Avaliação da Função Tiroideia

A Tiroide é uma glândula que se divide em lóbulos compostos por diversos folículos. Os folículos são estruturas em forma de anel que rodeiam uma cavidade fechada contendo o coloide, as hormonas da tiroide e a tiroglobulina (Tg). Esta glândula contém também células parafoliculares responsáveis pela síntese e secreção da calcitonina, uma hormona essencial ao metabolismo do cálcio. <sup>78</sup>

As hormonas produzidas pela tiroide são a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), assim como os seus precursores, a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT). Têm como funções o controlo do metabolismo basal, a estimulação do desenvolvimento neuronal e crescimento normal, promoção da maturação sexual, entre outras. <sup>74</sup>

A disfunção da tiroide é uma das doenças endócrinas mais comuns na prática clínica. As patologias mais comuns são o hipertiroidismo, o hipotiroidismo, a gota e os nódulos da tiroide. <sup>33</sup>

Existem diversos testes laboratoriais que permitem avaliar a evolução dos doentes com suspeita de disfunção tiroideia. Entre eles, o doseamento das hormonas da tiroide T4 e T3, e das suas formas livres, FT3 e FT4, da TSH, aTPO e aTg. <sup>33</sup>

### Tiroxina Total (T4) e Tiroxina Livre (FT4)

A T4 é uma hormona tiroideia produzida no coloide, através do acoplamento de duas moléculas de DIT, por ação da tiroide peroxidase (TPO). A secreção desta hormona para a circulação é influenciada pela hormona estimulante da tiroide (TSH) e por um mecanismo de feedback negativo que envolve a tiroide, a hipófise e o hipotálamo. <sup>74,78,103</sup>

A T4 circula ligada a proteínas transportadoras como a globulina ligante da tiroxina (TBG), albumina e pré-albumina ligante da tiroxina. A porção desta hormona que não

se liga a proteínas de transporte é denominada de tiroxina livre (FT4), sendo metabolicamente ativa.<sup>78,103</sup>

A medição da T4 total consiste no doseamento da secreção da T4 secretada pela tiroide, tanto ligada como livre, sofrendo influência direta dos níveis de hormonas transportadoras. Os resultados obtidos devem ser analisados em conjunto com os níveis de TBG, TSH e FT4.<sup>8</sup>

### **Triiodotironina Total (T3) e Triiodotironina Livre (FT3)**

A T3 é uma hormona produzida pela tiroide resultando da união de uma molécula de MIT e uma molécula de DIT, por ação da TPO. É também produzida através da conversão periférica da T4 em T3.<sup>78,104</sup>

Em semelhança à T4, a T3 circula ligada a proteínas transportadoras. No entanto, encontra-se, maioritariamente, no estado livre.<sup>78</sup>

A medição da T3 total presente no soro é útil na confirmação do diagnóstico de hipertiroidismo, especialmente em doentes com valores normais ou minimamente elevados de T4. Contudo, o seu tempo médio de vida em circulação é curto o que dificulta o seu doseamento.<sup>33,78</sup>

### **Hormona Estimulante da Tiroide (TSH)**

A secreção das hormonas da tiroide é estimulada pela hormona estimulante da tiroide (TSH), produzida na hipófise. Esta é, por sua vez, estimulada pela hormona libertadora da tirotrponina (TRH), secretada pelo hipotálamo. A sua síntese está dependente de um processo de feedback negativo que envolve as concentrações de FT3 e FT4.<sup>33,78,105</sup>

A determinação da TSH presente numa amostra é utilizada para monitorizar a funcionalidade da tiroide, auxiliando no diagnóstico do hipertiroidismo e hipotiroidismo e na monitorização da terapia de reposição desta glândula.<sup>8</sup>

É o parâmetro laboratorial que melhor reflete o estado em que se encontra a tiroide. Deverá ser o primeiro parâmetro medido, seguindo-se da FT4 se o valor de TSH estiver baixo e do anticorpo anti-peroxidase da tiroide (aTPO) se o valor for elevado.<sup>8</sup>

### **Anticorpos Anti-Tiroglobulina (Anti-Tg)**

Os autoanticorpos contra a tiroide são produzidos em resposta a doenças autoimunes desta glândula. Nestas patologias, ocorrem danos celulares por ligação dos anticorpos às membranas das células, originando lise celular e reações inflamatórias. Por consequência, advém uma alteração da função normal da tiroide.<sup>78</sup>

A tiroglobulina é sintetizada e secretada pelos folículos que compõem a tiroide. É uma hormona que reflete a presença de massas e danos nesta glândula, encontrando-se aumentada na doença de Graves, tiroidite e na gota nodular. Para além disso, é utilizada na monitorização da recorrência de diversos tipos de cancro da tiroide. No entanto, o seu valor clínico é limitado devido à presença de autoanticorpos anti-tiroglobulina, originando níveis séricos muito elevados ou muito diminuídos.<sup>78</sup>

O doseamento de autoanticorpos anti-Tg é bastante útil na identificação de doentes com doenças autoimunes da tiroide. Estes anticorpos podem ser detetados em doentes com doença de Graves e conjuntamente com anticorpos anti-peroxidase tiroideia em doentes com tiroidite de Hashimoto. No entanto, devido à heterogeneidade da Tg, estes anticorpos podem ser detetados noutras patologias autoimunes, como a artrite reumatoide, anemia perniciosa e diabetes mellitus do tipo 1.<sup>106</sup>

### **Anticorpos Anti-Peroxidase Tiroideia (aTPO)**

A tiroide peroxidase (TPO) é uma glicoproteína ligada à membrana que medeia a oxidação do iodeto e a incorporação da iodina nos resíduos de tirosina da tiroglobulina. Esta enzima catalisa as duas reações oxidativas responsáveis pela transformação da Tg em hormonas da tiroide.<sup>8,78</sup>

Os anticorpos anti-TPO estão envolvidos no processo de destruição dos tecidos associado com o hipotiroidismo na doença de Hashimoto e tiroidite atrópica. A deteção destes autoanticorpos é útil na identificação de doentes com doença autoimune da tiroide, sendo a sua testagem indicativa por si só da presença destas patologias.<sup>78,107</sup>

## **Avaliação do Metabolismo Fosfocálcico**

O esqueleto é um órgão metabolicamente ativo cuja remodelação é contínua ao longo da vida. A sua remodelação é necessária para manter a integridade estrutural do esqueleto assim como para assegurar as funções metabólicas de armazenamento de cálcio e fósforo. <sup>78</sup>

Os ossos dividem-se em osso cortical e osso trabecular. A função do osso cortical é, essencialmente, mecânica e protetora, enquanto o osso trabecular é metabolicamente ativo. Ambos são compostos por minerais inorgânicos, como o cálcio e fósforo, e por uma matriz orgânica. <sup>74,78</sup>

O processo de remodelação óssea ocorre devido à ação dos osteoclastos e osteoblastos, as principais células do tecido ósseo. Os osteoclastos reabsorvem o osso através da hidrólise da matriz orgânica. Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica e controlam a mineralização da mesma. <sup>74,78</sup>

A concentração plasmática do cálcio, fosfato e magnésio é dependente do balanço entre a deposição mineral e reabsorção óssea, absorção intestinal e excreção renal. Estes processos são regulados pelas hormona paratiroideia (PTH), calcitonina e 1,25-dihidroxitamina D. <sup>78</sup>

### **Cálcio**

O cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é um dos catiões mais prevalentes no corpo humano. No soro, existe em três formas distintas: livre ou ionizado, a forma fisiologicamente ativa, complexado a diversos aniões e ligado a proteínas. Para além disso, também se subdivide em cálcio intracelular, importante na contração muscular e divisão celular, e em cálcio extracelular, necessário à mineralização óssea e coagulação sanguínea. <sup>3,74</sup>

A homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  é mantida devido à ação da PTH, 1,25-dihidroxitamina D e calcitonina. Os principais órgãos envolvidos na sua manutenção são o esqueleto, os rins e o intestino. Estas hormonas regulam o cálcio sérico através da alteração da taxa de secreção em resposta às alterações na concentração de cálcio ionizado. <sup>3</sup>

Quando o conjunto de processos que regula o metabolismo cálcico se encontra desregulado, podem advir patologias como a Hipercalcemia e a Hipocalcemia.

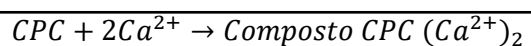
A Hipercalcemia corresponde ao aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em circulação, comparativamente ao valor normal expectável. Pode ser provocada por alterações nos

órgãos-alvo do metabolismo do cálcio ou por causas endócrinas. A nível endócrino, podem ocorrer alterações nos recetores do cálcio na paratiroide e libertação da PTH, ou alterações funcionais da vitamina D. <sup>3</sup>

A Hipocalcemia verifica-se quando existe uma diminuição dos níveis de cálcio sérico. Em semelhança à hipercalcemia, pode ser provocada por alterações na glândula paratiroide ou no metabolismo do magnésio. <sup>3</sup>

A determinação do Ca<sup>2+</sup> em amostras de soro, plasma ou urina permite diagnosticar patologias ao nível da glândula paratiroide, tecido ósseo, rins, entre outras.

Um dos métodos mais utilizados na determinação do cálcio ionizado recorre ao orto-cresolftaleína-complexona (CPC) para formar um complexo com o Ca<sup>2+</sup>.<sup>3</sup>



**Equação 23.** Equação da determinação do Ca<sup>2+</sup> ionizado. No método da orto-cresolftaleína-complexona (CPC), a amostra é acidificada originando a libertação do Ca<sup>2+</sup> complexado e ligado a proteínas. De seguida, em solução alcalina, a o-cresolftaleína-complexona forma um cromóforo vermelho com o cálcio que é medido a 570/580 nm. <sup>74,108</sup>

### **Fósforo Inorgânico**

Os compostos fosfato são encontrados em todas as células vivas e participam em diversos processos bioquímicos. O fósforo subdivide-se em fósforo orgânico e inorgânico. O fósforo inorgânico é a fração medida no soro e plasma. <sup>3,74</sup>

O fosfato presente no sangue pode ser absorvido no intestino a partir da dieta, libertado das células para a circulação e perdido pelo osso. A perda de regulação por parte dos rins altera a sua concentração no sangue. No entanto, existem outros fatores como a vitamina D e a calcitonina que afetam a regulação renal do fosfato. O fator mais importante é a PTH, cuja função é baixar a concentração no sangue através do aumento da excreção renal. <sup>3</sup>

A concentração sérica de fósforo apresenta um ritmo circadiano, sendo mais elevada durante a manhã e mais baixa durante a noite. Para além disso, está sujeita a alterações secundárias a fatores ambientais como a dieta, insulina e função renal. <sup>8</sup>

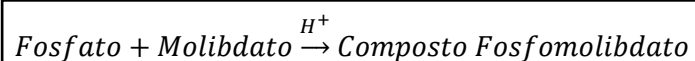
A alteração na concentração sérica de fosfato pode originar Hipofosfatemia e Hiperfosfatemia.

A Hipofosfatemia ocorre quando a concentração de fosfato inorgânico se encontra abaixo dos valores de referência. Pode ser provocada pela mudança do fosfato do espaço extracelular para o intracelular, desperdício renal, decréscimo da absorção intestinal e perda do fosfato intracelular. A secreção excessiva de PTH pode originar perda de fosfato na urina. <sup>74</sup>

A Hiperfosfatemia, aumento da concentração sérica de fosfato inorgânico, é secundária à incapacidade renal de excreção do fosfato, como na falha renal. Ocorrem ligeiros aumentos do fosfato sérico em indivíduos com níveis baixos de PTH, resistência à PTH ou acromegalia. Um rápido aumento pode estar associado com a hipocalcemia. <sup>74</sup>

Os diversos métodos utilizados baseiam-se na reação dos íons fosfato com molibdato de amónio para formar um complexo fosfomolibdato, medido espectrofotometricamente.

<sup>74</sup>



**Equação 24. Equação da reação para determinação do fosfato inorgânico.** O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amónio na presença de ácido sulfúrico para formar um composto fosfomolibdato não reduzido, medido numa reação de ponto final a 340/658 nm. <sup>109</sup>

## Magnésio

Os íons magnésio (Mg<sup>2+</sup>) são os segundos catiões mais abundantes depois do potássio. O Mg<sup>2+</sup> é cofator em diversos sistemas enzimáticos e importante em processos bioquímicos dependentes deste catião como a glicólise, metabolismo oxidativo e transporte transmembranar de potássio e cálcio. <sup>62</sup>

A regulação da concentração de magnésio é controlada, sobretudo, pelo rim que consegue reabsorver Mg<sup>2+</sup> em caso de deficiência ou excretar rapidamente o excesso em casos de sobrecarga. Para além disso, esta regulação está relacionada com os níveis de cálcio e sódio. <sup>3</sup>

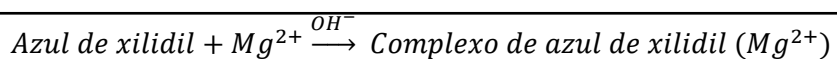
A homeostase do Mg<sup>2+</sup> é também afetada pela PTH, cuja função é aumentar a reabsorção renal de magnésio e a sua absorção no intestino. No entanto, mudanças nos níveis Ca<sup>2+</sup> têm um grande efeito na secreção da hormona referida. <sup>3</sup>

As patologias que surgem devido a alterações na concentração sérica de magnésio são a Hipomagnesemia e a Hiper magnesemia.

A Hipomagnesemia corresponde ao decréscimo dos níveis de magnésio em circulação. Pode ter diversas origens, entre as quais patologias severas que afetem o sistema endócrino como o hipertireoidismo e a hipercalcemia, aumentando a excreção renal de  $Mg^{2+}$  por excesso de iões  $Ca^{2+}$ .<sup>3</sup>

A Hiper magnesemia, o aumento da concentração de magnésio no soro, está também associada a doenças endócrinas. Patologias na tireoide que provoquem a deficiência em tiroxina, por exemplo, provocam um decréscimo da reabsorção tubular de  $Mg^{2+}$  elevando a sua concentração.<sup>3</sup>

O magnésio total é medido através de métodos espectrofotométricos que utilizam reagentes como o azul de xilidil.



**Equação 25.** Equação da reação de determinação da concentração de Magnésio total. Os iões de magnésio reagem com o azul de xilidil em solução alcalina para formar um composto colorido solúvel em água. A concentração de magnésio na amostra é diretamente proporcional ao aumento da absorvância do azul de xilidil a 505/694 nm.<sup>110</sup>

### **Hormona da Paratiroide**

A PTH é secretada a partir das glândulas paratiroides localizadas na tireoide. Existem múltiplos fatores que controlam a libertação de PTH, dos quais o cálcio e o magnésio.<sup>3,78</sup>

A principal função da PTH é manter constante a concentração de cálcio ionizado no fluido extracelular através da estimulação da reabsorção osteoclástica e libertação do cálcio e fosfato a partir do osso, estimulação da reabsorção de cálcio e inibição da reabsorção de fosfato nos túbulos renais, etc.<sup>78</sup>

As glândulas paratiroides possuem recetores especializados de cálcio que respondem ao aumento ou diminuição do mesmo pelo aumento ou decréscimo da secreção de PTH. O processo que regula a libertação desta hormona, em resposta aos níveis de cálcio, é um processo endócrino de feedback negativo.<sup>3</sup>

As principais doenças associadas à secreção de PTH são o hiperparatiroidismo e o hipoparatiroidismo.

O hiperparatiroidismo corresponde à secreção descontrolada de PTH, independentemente da concentração plasmática de cálcio. É a principal causa de hipercalcemia.<sup>62</sup>

O hipoparatiroidismo consiste no decréscimo dos níveis de PTH em circulação. Esta patologia origina uma baixa excreção de fosfato pelos rins, estando na origem da hiperfosfatemia.<sup>62</sup>

O doseamento dos níveis de PTH, para além do diagnóstico da hipercalcemia e hiperfosfatemia, são utilizados para avaliar outras doenças ósseas, incluindo a osteoporose.<sup>111</sup>

A determinação da PTH é realizada através de um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que utiliza tecnologia quimioluminométrica direta, recorrendo a dois anticorpos anti-humanos da PTH.<sup>111</sup>

### **Calcitonina**

A calcitonina é sintetizada e secretada pelas células parafoliculares da tiroide, e atua nos ossos, rins e trato gastrointestinal. A concentração de cálcio ionizado é o principal regulador da secreção de calcitonina.<sup>78</sup>

Esta hormona é secretada em resposta a estímulos hipercalcémicos, reduzindo a concentração de cálcio pela inibição da PTH e da vitamina D. Para além disso, a calcitonina inibe a reabsorção osteoclástica bloqueando a libertação de cálcio e fosfato a partir do osso.<sup>3,33</sup>

Podem ser encontrados níveis elevados de calcitonina em diversas patologias, nomeadamente, no carcinoma medular da tiroide. Para além disso, pode estar aumentada em doenças leucémicas e mieloproliferativas. Elevações desta hormona acompanham o hiperparatiroidismo, insuficiência renal e doença inflamatória crónica.

112

O doseamento da calcitonina pode ser realizado através de imunoensaio sanduíche automatizado que utiliza quimioluminescência direta. É utilizado um anticorpo recombinante marcado com um éster de acridina.

## Anexos

### Anexo 1. Perfil Imunofenotípico de Patologias Linfoproliferativas dos Linfócitos B

Leucemia Linfocítica Crônica B	Leucemia a Hairy Cells	Linfoma do Manto	Linfoma de Burkitt
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD19+</li> <li>• CD20 + (fraco)</li> <li>• CD22 + (fraco)</li> <li>• CD79b + (fraco ou ausente)</li> <li>• CD5 +</li> <li>• CD23 +</li> <li>• CD10-</li> <li>• CD38 (expressão variável sendo na maioria das vezes negativo)</li> <li>• Expressão reduzida ou ausente de cadeias pesadas de IgM ou IgG</li> <li>• Expressão reduzida ou ausente de cadeias leves <i>kappa</i> ou <i>lambda</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD19 +</li> <li>• CD20 + (forte)</li> <li>• CD22 + (forte)</li> <li>• CD79b +</li> <li>• FMC7 +</li> <li>• CD11c +</li> <li>• CD25 +</li> <li>• CD103 +</li> <li>• CD123 +</li> <li>• CD5-</li> <li>• CD10-</li> </ul> <p>Restrição de cadeias leves (<i>kappa</i> ou <i>lambda</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD19 +</li> <li>• CD20 +</li> <li>• CD22 +</li> <li>• FMC7 +</li> <li>• CD5 +</li> <li>• CD43 +</li> <li>• CD23- (pode ser positivo fraco)</li> <li>• CD10-</li> <li>• Expressão de IgM ou IgD (forte)</li> </ul> <p>Restrição de cadeias leves <i>lambda</i> (mais frequente do que <i>kappa</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD19 +</li> <li>• CD20 +</li> <li>• CD22 +</li> <li>• CD79a</li> <li>• CD10 +</li> <li>• CD38 +</li> <li>• CD43 +</li> <li>• CD77 +</li> <li>• CD5-</li> <li>• CD23-</li> <li>• CD34-</li> <li>• CD18 (expressão fraca ou ausente)</li> <li>• CD54 (expressão fraca ou ausente)</li> <li>• CD44-</li> <li>• Expressão de imunoglobulinas de membrana (geralmente IgM)</li> </ul> <p>Restrição de cadeias leves (<i>kappa</i> ou <i>lambda</i>)</p>

(Adaptado de: "Perfis Imunofenotípicos característicos das doenças linfoproliferativas de células B", 2014)

**Anexo 2. Valores de Referência em Hematologia**

Parâmetros	Valores de Referência		Unidades
	Homem	Mulher	
Eritrócitos	4.3 – 5.9	3.5 – 5.5	x 10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobina	13.5 – 17.5	12.0 – 16.0	g/dL
Hematócrito	41.0 – 53.0	36.0 – 46.0	%
Hemoglobina Globular Média (HGM)	25.0 – 35.0		pg
Volume Globular Médio (VGM)	80.0 – 100.0		fL
Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)	31.0 – 36.0		%
RDW	11.5 – 14.5		%
Reticulócitos	0.5 – 1.5		%
Leucócitos	4.5 – 11.0		x 10 <sup>9</sup> /L
Neutrófilos Segmentados	54.0 – 62.0		%
Neutrófilos em Banda	3.0 – 5.0		%
Eosinófilos	1.0 – 3.0		%
Basófilos	0 – 0.75		%
Linfócitos	25.0 – 33.0		%
Monócitos	3.0 – 7.0		%
Plaquetas	150.0 – 400.0		x 10 <sup>9</sup> /L
Volume Plaquetar Médio (VPM)	7.0 – 12.0		fL
Velocidade de Sedimentação	0 – 15.0	0 – 20.0	mm/1h
Tempo de Protrombina (PT)	< 12		s
INR	2.0 – 3.0		
Tempo Parcial de Tromboplastina Ativado (APTT)	< 28		s
Tempo de Trombina	≤ 21		s
Fibrinogênio	220 – 498		mg/dL
Fatores da Coagulação V, VII	50 – 150		%
Fator da Coagulação VIII	50 – 186		%
Antitrombina (AT)	78 – 126		%
Atividade da Proteína C	70 – 140		%
Atividade da Proteína S	65 – 140		%
D- dímeros	110 – 240		ng/mL
Anticoagulante Lúpico	Diminuído em > 8		s
Hemoglobina Glicada	≤ 6		%

(Adaptado de: “Valores Laboratoriais de Referência”, 2018; “Rodak’s Hematology- Clinical Principles and Applications”, 5ª edição, 2015)

### Anexo 3. Padrões Nucleares de Fluorescência na determinação de Anticorpos Antinucleares (ANA) <sup>41,113</sup>

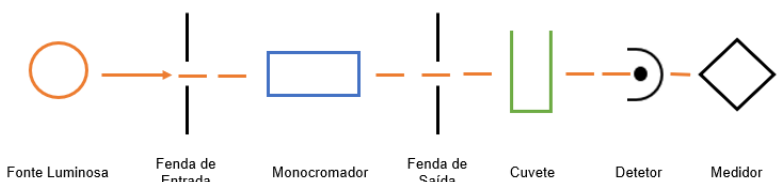
Padrão Nuclear	Descrição	Antígenos Alvo	Patologias Associadas
<b>Homogêneo (AC-1)</b>	Fluorescência homogênea do núcleo celular. Núcleos corados dependendo do substrato. Células em mitose com cromatina corada.	dsDNA ssDNA Nucleossomas Histonas	Lúpus Eritematoso Sistêmico Lúpus Eritematoso Sistêmico induzido por medicamentos Artrite Idiopática Juvenil
<b>Finogranular Denso (AC-2)</b>	Padrão Finogranular nos núcleos das células em interfase. Os núcleos apresentam granulação irregular. A placa metafásica apresenta padrão granular com grânulos grosseiros característicos.	DFS70	Não está associado a doença autoimune sistêmica. Pode ser observado, raramente, no Síndrome de Sjögren, Esclerose Sistêmica e Lúpus Eritematoso Sistêmico.
<b>Centrómero (AC-3)</b>	Grânulos nas células em interfase e alinhados na placa equatorial em células em mitose.	CENP-A e B	Esclerose Sistêmica Progressiva
<b>Mosqueado (AC-5)</b>	Nucleoplasma granular pontilhado. Células em mitose apresentam cromatina sem fluorescência. Nucléolos com ou sem coloração.	hnRNP U1-nRNP Sm RNA polimerase III	Lúpus Eritematoso Sistêmico Doença Mista do Tecido Conjuntivo
<b>Nucleolar homogêneo (AC-8)</b>	Fluorescência difusa de todo o nucléolo com ausência de fluorescência na placa metafásica cromossômica.	PM-Scl	Esclerose Sistêmica Progressiva

**Anexo 4. Valores de Referência da Eletroforese de Proteínas**

Frações Proteicas	Proteínas Constituintes	Frações Aumentadas	Frações Diminuídas	Valores de Referência	Unidades
<b>Albumina</b>	Albumina	Desidratação aguda	- Analbuminemia - Gravidez - Doença hepática	52 - 65	% de proteínas totais
				3.2 - 5.6	g/dL
<b>Alfa-1</b>	$\alpha$ 1-antitripsina $\alpha$ 1-lipoproteína $\alpha$ 1-glicoproteína ácida $\alpha$ -fetoproteína	Estados Inflamatórios Gravidez	- Deficiência em $\alpha$ 1-antiprotease	2.5 – 5.0	% de proteínas totais
				0.1 – 0.4	g/dL
<b>Alfa-2</b>	$\alpha$ 2-macroglobulina haptoglobina ceruloplasmina	Síndrome nefrótica Estados Inflamatórios Contraceptivos orais Terapia com corticosteroides Hipertiroidismo	- Hemólise in vivo - Doença Hepática	7.0 – 13.0	% de proteínas totais
				0.4 – 1.2	g/dL
<b>Beta</b>	Transferrina Hemopexina Complemento C3 $\beta$ -lipoproteínas $\beta$ <sub>2</sub> -microglobulina	Hiperlipidemia Hemoglobinemia Anemia ferropénica	- Hipo- $\beta$ - lipoproteinemias	8.0 – 14.0	% de proteínas totais
				0.5 – 1.1	g/dL
<b>Gama</b>	Imunoglobulinas G, A, D, E e M	Gamopatias monoclonais	Imunodeficiência	12.0 – 22.0	% de proteínas totais
				0.5 – 1.6	g/dL

(Adaptado de: “Pocket Guide To Diagnostic Tests”, 2012 ; “Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods”, 23ª edição, 2016)

## Anexo 5. Princípios Analíticos utilizados na valência de Bioquímica

Princípio Analítico	Descrição	Analizador
<b>Espectrofotometria</b>	<p>Consiste na medição da intensidade da luz em determinados comprimentos de onda. O feixe de luz proveniente da fonte luminosa atravessa a fenda de entrada e atinge o monocromador que seleciona uma gama específica do espectro. Segue para a cuvete onde é absorvida parte da energia radiante. A luz não absorvida passa para o detetor sendo convertida em energia elétrica que é quantificada pelo medidor. <sup>74,114</sup></p>  <p>Fonte Luminosa    Fenda de Entrada    Monocromador    Fenda de Saída    Cuvete    Detetor    Medidor</p>	Atellica® Chemistry Analyzer
<b>Turbidimetria</b>	<p>É uma técnica de medição da luz dispersa, sendo utilizado um espectrofotômetro para determinar a concentração do analito na amostra. A quantidade de luz bloqueada pela suspensão de partículas depende não só da concentração, mas também do seu tamanho. A turbidez da solução diminui a intensidade do feixe incidente enquanto este atravessa as partículas em solução. A medição deste decréscimo de intensidade é denominada de turbidimetria. <sup>74,114</sup></p>	Atellica® Chemistry Analyzer
<b><i>Integrated Multisensor Technology</i></b>	<p>O A-LYTE® Integrated Multisensor é utilizado na determinação quantitativa dos íons sódio, potássio e cloro em soro, plasma e urina. O multisensor é composto por um conjunto de quatro sensores, em que três desses são seletivos para o sódio, potássio e cloro, e o último de referência. A amostra diluída pelo analisador é colocada no sensor e os íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> estabelecem um equilíbrio com a superfície do eletrodo. O potencial elétrico gerado dessa interação é comparado ao potencial elétrico produzido numa solução padrão. A concentração dos íons é obtida através da equação de Nernst. <sup>79</sup></p>	Atellica® Chemistry Analyzer
<b>Quimioluminescência</b>	<p>Consiste na emissão de luz quando um eletrão regressa de um estado excitado ou de maior energia para um nível de energia mais baixo. A reação de excitação é provocada por uma reação química com compostos como luminol ou ésteres de acridina. A radiação emitida é medida pelo tubo fotomultiplicador (PMT) que se encontra presente no analisador e o sinal obtido é relacionado com a concentração do analito presente na amostra. <sup>74,115</sup></p>	Atellica® Immunoassay Analyzer

**Anexo 6. Princípios analíticos dos parâmetros bioquímicos da Tireoide**

<b>Parâmetros Laboratoriais</b>	<b>Princípio Analítico</b>
<b>Tiroxina Total (T4)</b>	O doseamento é realizado por um imunoensaio competitivo de quimiluminescência direta. A T4 presente na amostra compete com a T4 ligada covalentemente a partículas paramagnéticas na fase sólida por um anticorpo anti-T4 monoclonal de rato marcado com éster de acridina. A quantidade da hormona presente na amostra é inversamente proporcional à quantidade de unidades de luz relativa detetadas pelo equipamento analítico. <sup>103</sup>
<b>Tiroxina Livre (FT4)</b>	O princípio analítico é semelhante ao da T4. A hormona na sua porção livre presente na amostra compete com a T4 marcada com éster de acridina por um anticorpo anti-T4 policlonal biotilado de coelho. O anticorpo anti-T4 marcado com biotina está ligado à avidina que, por sua vez, está ligada por covalência às partículas paramagnéticas na fase sólida. A quantidade de FT4 presente na amostra analisada é diretamente proporcional à quantidade de unidades de luz relativa detetadas pelo sistema. <sup>116</sup>
<b>Triiodotironina Total (T3)</b>	O doseamento da T3 é efetuado através de um imunoensaio competitivo de quimiluminescência direta. Como descrito para o doseamento da T4, a T3 presente na amostra compete com um análogo da T3, ligado por covalência às partículas paramagnéticas na fase sólida, por anticorpos anti-T3 monoclonais de rato marcados com éster de acridina. A quantidade de unidades de luz relativa detetadas é inversamente proporcional à quantidade de T3 presente na amostra. <sup>104</sup>
<b>Triiodotironina Livre (FT3)</b>	A FT3 pode ser quantificada recorrendo à mesma tecnologia. A FT3 vai competir com um análogo da T3, ligado a partículas paramagnéticas na fase sólida, por anticorpos anti-T3 monoclonais de rato marcados com éster de acridina. A FT3 presente apresenta uma relação inversa com as unidades de luz relativas detetadas. <sup>117</sup>
<b>Hormona Estimulante da Tireoide (TSH)</b>	O ensaio de quantificação da TSH é um ensaio de terceira geração onde ocorre uma reação entre um anticorpo anti-FITC monoclonal ligado a partículas paramagnéticas, um anticorpo anti-TSH monoclonal de rato marcado com FITC, um rastreador composto por um éster de acridina e um anticorpo anti-TSH monoclonal de rato conjugado com albumina de soro bovino para deteção quimioluminométrica. A concentração da hormona presente na amostra está diretamente relacionada com as unidades de luz relativa detetadas pelo sistema analítico. <sup>105</sup>
<b>Anticorpos Anti-Tiroglobulina (Anti-Tg)</b>	O ensaio de deteção dos anticorpos anti-Tg consiste num imunoensaio de ponte de analito automatizado que recorre à quimiluminescência direta de um éster de acridina. É utilizada tiroglobulina humana marcado com um éster de acridina na fase sólida. A Tg é biotilada e pré-formada de acordo com partículas paramagnéticas revestidas por estreptavidina. O anti-Tg presente na amostra liga-se à tiroglobulina na fase sólida, formando uma ponte. Existe uma relação direta entre a concentração de analito presente e a quantidade de unidades de luz relativa detetadas. <sup>106</sup>
<b>Anticorpos Anti-Peroxidase Tireoideia (Anti-TPO)</b>	A deteção dos anti-TPO é efetuada através de um imunoensaio competitivo que recorre à quimiluminescência. O anti-TPO na amostra compete com o anti-TPO monoclonal de rato, ligado a partículas paramagnéticas na fase sólida, por TPO humana complexada com um éster de acridina marcada com um anticorpo anti-TPO. A quantidade de anti-TPO na amostra é inversamente proporcional à quantidade de unidades de luz relativa detetadas. <sup>107</sup>

**Anexo 7. Valores de Referência em Bioquímica**

Parâmetros	Tipo de Amostra	Valores de Referência		Unidades
		Homem	Mulher	
Ácido Úrico	Soro	4 – 8.5	2.7 – 7.3	mg/dL
Albumina	Soro	3.8 – 5		g/dL
Amilase	Soro	16 – 120		unidades somogyi/ dL
Aspartato Amino-Transferase (AST)	Soro	8 - 33		U/L a 37°C
Alanina Amino-Transferase (ALT)	Soro	4 – 36		U/L a 37°C
Apo A	Soro	80 - 151	80 - 170	mg/dL
Apo B	Soro/ Plasma	50 - 123	25 - 120	mg/dL
Bilirrubina Total	Soro	0.1 – 1.2		mg/dL
Bilirrubina Conjugada	Soro	<0.3		mg/dL
Cálcio (Ionizado)	Soro	4 – 4.8		mg/dL
Cálcio (Total)	Soro	9.2 – 11.0		mg/dL
Calcitonina	Soro	25	20	pg/mL
Cloro	Soro	95 - 103		mmol/L
Colesterol Total	Soro	150 – 250		mg/dL
Colesterol HDL	Plasma	40 - 60		mg/dL
Colesterol LDL	Soro/Plasma	60 - 130		mg/dL
Creatina Quinase (CK)	Soro	55 - 170	30 - 135	U/L a 37°C
Creatinina	Soro/ Plasma	0.6 – 1.2		mg/dL
	Urina (24h)	1 - 2	0.8 – 1.8	g/dia
Clearance da Creatinina	Soro/ Plasma e Urina	107 - 139	87 - 107	mL/min
Capacidade Total de Fixação do Ferro	Soro	250 - 400		µg/dL
Ferro	Soro	60 – 150		µg/dL
Ferritina	Soro	15 - 200	12 - 150	ng/mL
Fosfatase Alcalina (ALP)	Soro	20 – 130		U/L a 37°C
Fósforo Inorgânico	Soro	2.3 – 4.7		mg/dL
Frutosamina	Soro	1.5 – 2.7		mmol/L
Gama-Glutamiltransferase	Soro	5 – 40		U/L a 37°C
Glucose	Soro/ Plasma	70 - 110		mg/dL
Hormona Estimulante da Tireoide (TSH)	Soro	0.5 – 5		µU/mL
Hormona da Paratireoide (PTH)	Soro	10 – 50		pg/mL
Insulina	Plasma	11 – 240		µU/mL
Lactato-Desidrogenase (LDH)	Soro	50 - 200		U/L
Lipase	Soro	14 – 280		mU/mL
Magnésio	Soro	0.65 – 1.05		mmol/L
Microalbuminúria	Urina (24h)	15 – 150		mg/dia
Mioglobina	Soro	<90		µg/L
Potássio	Plasma	3.8 – 5		mmol/L
Proteínas Totais	Soro	6 – 7.8		g/dL
Proteinúria	Urina (24h)	40 - 150		mg/dia
Sódio	Plasma	136 – 142		mmol/L
Triiodotironina Total (T3)	Soro	80 – 200		mg/dL

(Adaptado de: “Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods”, 23ª edição, 2016; “Laboratory Medicine- The Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory”, 2ª edição, 2014)

**Anexo 7. Valores de Referência em Bioquímica (continuação)**

Parâmetros	Tipo de Amostra	Valores de Referência		Unidades
		Homem	Mulher	
<b>Tiroxina Total (T4)</b>	Soro	5.5 – 12.5		µg/dL
<b>Tiroxina Livre (FT4)</b>	Soro	0.9 – 2.3		ng/dL
<b>Transferrina</b>	Soro	200 - 380		mg/dL
<b>Triglicéridos</b>	Soro	10 – 190		mg/dL
<b>Troponina I</b>	Soro	<2		mg/mL
<b>Ureia</b>	Soro	8 – 23		mg/dL

(Adaptado de: “Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods”, 23ª edição, 2016; “Laboratory Medicine- The Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory”, 2ª edição, 2014)

## Bibliografia

1. McCall RE, Tankersley CM. *Phlebotomy Essentials*. 5a. Wolters Kluwer / Lippincott Williams and Wilkins; 2008.
2. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnostics and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Elsevier; 2011. doi:10.1016/b978-1-4377-0974-2.00017-8
3. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations*. sixth edit. Wolters Kluwer / Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
4. Keohane E, Smith L, Walenga J. *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*.; 2015. <https://books.google.com/books?id=jjBTBwAAQBAJ&pgis=1>.
5. Oliveira B da R, Cruz BR, Moss M de F, Borato DCK. Influência do tempo de centrifugação em testes de coagulação: tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial. <http://www.rbac.org.br/artigos/influencia-do-tempo-de-centrifugacao-em-testes-de-coagulacao-tempo-de-protrombina-e-tempo-de-tromboplastina-parcial/>. Published 2018. Accessed August 8, 2020.
6. Hedley BD, Keeney M, Brown W. Initial performance evaluation of the UniCel DxH 800 Coulter cellular analysis system. 2011;45-56. doi:10.1111/j.1751-553X.2010.01239.x
7. McPhee DNCMLMPSJ. *Pocket Guide to Diagnostic Tests*. 6a. Lange; 2012.
8. Mary Louise Turgeon. *Clinical Hematology Theory and Procedures*. fifth edit. Lippincott Williams and Wilkins; 2012.
9. Laffan BJBIBMA. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 12th ed. (Lewis ESM, ed.). Elsevier; 2017.
10. Bain BJ. *Blood Cells - A Practical Guide*. fifth edit. Wiley Blackwell; 2015.
11. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(5):448-457. doi:10.1111/ijlh.12693
12. Cha C, Park C, Cha YJ, Kim HK. Erythrocyte Sedimentation Rate Measurements by TEST 1 Better Reflect Inflammation Than Do Those by the Westergren Method in Patients With Malignancy , Autoimmune Disease , or Infection. 2009:189-194. doi:10.1309/AJCP0U1ASTLRANIJ
13. Giavarina D, Capuzzo S, Cauduro F, Carta M, Soffiati G. Internal quality control for erythrocyte sedimentation rate measured by TEST-1 analyzer. *Clin Lab*. 2002;48(9-10):459-462.
14. John WG, Little R, Sacks DB, et al. Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1c analyser. 2017;53(2):319-327. doi:10.1515/cclm-2014-0589.Multicentre
15. Herold DA, Boyd JC, Bruns DE, et al. Measurement of glycosylated hemoglobins using boronate affinity chromatography. *Ann Clin Lab Sci*. 1983;13(6):482-488.
16. Trinity Biotech. Boronate Affinity Chromatography. <https://www.trinitybiotech.com/haemoglobins/boronate-affinity-chromatography/>. Published 2020.
17. Thevarajah TM, Nani N, Chew YY. Performance evaluation of the Arkray Adams HA-8160 HbA1c analyser. *Malays J Pathol*. 2008;30(2):81-86.

## Relatório de Estágio – Mariana Teles

18. Azevedo T, Pinto S, Palma JCO; IM. Comparação dos resultados do doseamento de hemoglobina A1c obtidos por sistemas portáteis com o método de referência. Rev Port Endocrinol Diabetes e Metab. 2011:15-22.
19. Ribeiro IS. Hematologia - Da Prática Clínica à Teoria. 1st ed. Lisboa: LIDEL; 2015.
20. Diagnostics SH. Plasma de Controle N.; 2010.
21. Diagnostics SH. Plasma de Controle P.; 2010.
22. Diagnostics SH. Multicalibrador TP.; 2013.
23. Silberstein RHEJBJSJSBFLE. Hematology: Basic Principles and Practice. 5th ed. Elsevier; 2008. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
24. Greer JP. Wintrobe's Clinical Hematology. 13th ed. Wolters Kluwer; 2014.
25. Siemens. Plasma Com Deficiência de Factor de Coagulação VII.; 2018.
26. Siemens. Reagente de Rastreio LA 1/ Reagente de Confirmação LA 2.; 2017.
27. Rad B. Indirect Antiglobulin Test.; 2020. doi:10.32388/8lcy8x
28. Delmonte OM, Fleisher TA. Flow cytometry: Surface markers and beyond. J Allergy Clin Immunol. 2019;143(2):528-537. doi:10.1016/j.jaci.2018.08.011
29. Coulter B. Navios Ex Flow Cytometer.; 2017.
30. Sereno JM da GMM. Perfis imunofenotípicos caraterísticos das doenças linfoproliferativas de células B. 2014.
31. Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 5th ed. Elsevier; 2016. doi:978-1-4557-0707-2
32. Hammer GD, McPhee SJ. Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine. 8a. McGraw- Hill Education; 2019.
33. Actor JK. Introductory Immunology- Basic Concepts for Interdisciplinary Applications. Elsevier; 2014. doi:10.1016/c2013-0-09949-5
34. Zabriskie JB. Essential Clinical Immunology.; 2009. doi:10.1017/CBO9780511575266
35. Voigt J, Krause C, Rohwäder E, et al. Automated indirect immunofluorescence evaluation of antinuclear autoantibodies on HEp-2 cells. Clin Dev Immunol. 2012;2012:11-15. doi:10.1155/2012/651058
36. Dasgupta A, Wahed A. Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. Elsevier; 2014.
37. Turgeon ML. Linnê and Ringsrud's Clinical Laboratory Science- Concepts, Procedures, and Clinical Applications. 7a. Elsevier; 2016.
38. Ponomarev G V., Arlazarov VL, Gelfand MS, Kazanov MD. ANA HEp-2 cells image classification using number, size, shape and localization of targeted cell regions. Pattern Recognit. 2014;47(7):2360-2366. doi:10.1016/j.patcog.2013.09.027
39. EUROIMMUN. IIFT: ANA Mosaico 1 EUOPattern.; 2020.

## Relatório de Estágio – Mariana Teles

40. Euroimmun. ANA Diagnostics Using Indirect Immunofluorescence.; 2019. <https://www.euroimmun.com/products/indications/autoantikrper-diagnostik/rheumatology/collagenosis/aak-gegen-zellkerne-ana.html>.
41. Savige J, Pollock W, Trevisin M. What do antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) tell us? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005;19(2 SPEC. ISS.):263-276. doi:10.1016/j.berh.2004.10.003
42. EUROIMMUN. Granulócito Mosaico e Europlus Granulócito Mosaico EUROPattern.; 2019.
43. Toh BH. Diagnostic autoantibodies for autoimmune liver diseases. *Clin Transl Immunol.* 2017;6(5):e139-5. doi:10.1038/cti.2017.14
44. Sebode M, Weiler-Normann C, Liwinski T, Schramm C. Autoantibodies in autoimmune liver disease-clinical and diagnostic relevance. *Front Immunol.* 2018;9(MAR):1-12. doi:10.3389/fimmu.2018.00609
45. EUROIMMUN. IFI: Mosaicos Hepáticos EUROPattern.; 2020.
46. EUROIMMUN. EUROLINE ANA Profile 3 Plus DFS70 (IgG). 2019:16. [http://shop.tinyteria.com/index.php?route=extension/module/free\\_downloads/download&did=1370](http://shop.tinyteria.com/index.php?route=extension/module/free_downloads/download&did=1370).
47. Stevens CD. *Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective.* 3a. F.A. Davis Company; 2010. doi:10.3109/03630269609027927
48. Turgeon ML. *Immunology and Serology in Laboratory Medicine.* 5a. Elsevier; 2014.
49. Alhabbab RY. *Basic Serological Testing.* 1a. Springer; 2018. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-319-77694-1>.
50. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medical Microbiology.* New York: Thieme; 2005.
51. Brunelli M. *Fever Slide Test Brucella Abortus.*; 2019. <http://www.biolifeitaliana.it/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecnico-italiano/ST-XC100842.pdf>.
52. BiO-RAD. *Brucella Rose Bengale.*; 2014. [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/63231\\_881168\\_PT.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/63231_881168_PT.pdf).
53. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology.* 26a. Lange; 2013. doi:10.1016/B978-0-323-40181-4.00114-6
54. *Diagnostics O. IMMUTREP® VDRL ANTIGEN.*; 2017. <http://www.omegadiagnostics.com/Portals/0/IFU/Immutrep VDRL CE Globe A5 V5.pdf>.
55. *Omega Diagnostics. IMMUTREP® RPR ANTIGEN.*; 2015. <http://www.omegadiagnostics.com/portals/0/english6.pdf>.
56. *Diagnostics O. IMMUTREP® TPHA.*; 2013. <http://www.omegadiagnostics.com/portals/0/english7.pdf>.
57. Brunelli M. *Waalser Rose Test.*; 2015. <http://www.biolifeit.com/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecnico-inglese/TS-UA80250.pdf>.
58. *Abbott. Clearview® IM II.*; 2020. [https://www.mddoctorsdirect.com/wp-content/uploads/2020/05/CV506815N\\_ENG.pdf](https://www.mddoctorsdirect.com/wp-content/uploads/2020/05/CV506815N_ENG.pdf).

59. Carter J, Saunders V. *Virology: Principles and Applications*. Wiley; 2007.
60. Organization (WHO) WH. WHO Prequalification of Diagnostics Programme PUBLIC REPORT.; 2017. [https://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-rdts/170524\\_amended\\_final\\_pr\\_0027\\_012\\_00.pdf?ua=1](https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-rdts/170524_amended_final_pr_0027_012_00.pdf?ua=1).
61. Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DSJ. *Clinical Biochemistry - An Illustrated Colour Text*. 5a. Elsevier; 2013. doi:10.5005/jp/books/12728\_28
62. Healthineers S. *Atellica® Solution Com Sample Handler*.; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=603831>.
63. Reixach C, Garcia A, Belles C, et al. Evaluation of new immunochemistry analyzer Atelica Solution. *Clin Chim Acta*. 2019;493:S13. doi:10.1016/j.cca.2019.03.036
64. Perlman RL, Heung M. Renal Disease. In: Hammer GD, McPhee SJ, eds. *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*. 8a. McGraw- Hill Education; 2019:1097-1148.
65. Lynch KL, Wu AHB. Renal Function. In: *Clinical Chemistry*. 6a. Lippincott Williams and Wilkins; 2010:557-576.
66. Lamb EJ, Price CP. Kidney Function Tests - Creatinine, Urea, and Uric Acid. In: Burtis CA, Bruns DE, eds. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7a. Elsevier; 2015:390-400.
67. Delaney MP, Price CP, Lamb EJ. Kidney Disease. In: Burtis CA, Bruns DE, eds. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7a. Elsevier; 2015:677-705.
68. Frank EL. Nonprotein Nitrogen Compounds. In: Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE, eds. *Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations*. 6a.; 2010:266-279.
69. Strasinger SK, Lorenzo MS Di. *Urinalysis and Body Fluids*. Vol 46. 5a. E. A. Davis Company; 2008. doi:10.1309/lmze9pxb0a1ojlhd
70. Healthineers S. *Creatinina*.; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=672826>.
71. Healthineers S. *Azoto Ureico*.; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=649127>.
72. Healthineers S. *Ácido Úrico*.; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=629922>.
73. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7a. Elsevier; 2015. <http://evolve.elsevier.com/Tietz/fundamentals>.
74. Laposata M. *Laboratory Medicine - The Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory*. 2a. McGraw- Hill Education; 2014.
75. Healthineers S. *Proteína Total (Urina)*. Vol 2.; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671984>.
76. Healthineers S. *Microalbumina\_2*.; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=677070>.
77. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 23a. Elsevier; 2017. doi:10.1309/xl9u-4dyg-mj76-xcc8

## Relatório de Estágio – Mariana Teles

78. Healthineers S. Multissensor Integrado A-LYTE (IMT Na K Cl).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671827>.
79. Healthineers S. Proteína Total II (TP).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=648705>.
80. Healthineers S. Albumina (Alb).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671023>.
81. Healthineers S. Bilirrubina Total\_2 (TBil\_2). Vol 2.; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=672134>.
82. Healthineers S. Bilirrubina Direta 2 (DBil\_2).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=648931>.
83. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, et al. Recomendações da ESC/EAS para a abordagem clínica das dislipidemias. Eur Heart J. 2011;32(14):1769-1818. doi:10.1093/eurheartj/ehr158
84. Healthineers S. Colesterol\_2 (Chol\_2).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671319>.
85. Healthineers S. Triglicérides (Concentrado) (Trig).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671557>.
86. Kontush A. HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT): Relevance to Cardiovascular Disease. Trends Mol Med. 2020:1-15. doi:10.1016/j.molmed.2020.07.005
87. Healthineers S. Colesterol HDL Direto (D-HDL).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=675952>.
88. Healthineers S. Colesterol LDL Direto (DLDL).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=690559>.
89. Healthineers S. Apolipoproteína A-1 (APO A1).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=670132>.
90. Healthineers S. Apolipoproteína B (APO B).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=670108>.
91. Healthineers S. Mioglobina (MYO).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=628534>.
92. Healthineers S. Troponina I de Alta Sensibilidade (TnIH).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=637596>.
93. Direção-Geral da Saúde. Diagnóstico e Classificação Da Diabetes Mellitus.; 2011. <https://www.dgs.pt/programa-nacional-para-a-diabetes/circulares-normas-e-orientacoes/norma-da-direccao-geral-da-saude-n-0022011-de-14012011-pdf.aspx>.
94. Healthineers S. Glicose Hexoquinase\_3 (GluH\_3).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=648740>.
95. Healthineers S. Insulina (IRI).; 2017. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=734995>.
96. Healthineers S. Frutosamina (Fruc).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=670869>.

## Relatório de Estágio – Mariana Teles

97. Crichton R. Iron Metabolism- From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences. Vol 4. 4a. Wiley; 2016.
98. Healthineers S. Ferro\_2 (Iron\_2).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=378231>.
99. Pinto AM. Fisiopatologia- Fundamentos e Aplicações. 2a. LIDEL; 2013.
100. Healthineers S. Pancreatic Amylase\_2 (PAMY\_2).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=672120>.
101. Healthineers S. Lipase (Lip).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=677045>.
102. Healthineers S. Tiroxina Total (T4).; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=760247>.
103. Healthineers S. Triiodotironina Total (T3).; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=760216>.
104. Healthineers S. Hormona Estimulante Da Tireoide 3-Ultra (TSH3-UL).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=627761>.
105. Healthineers S. Anti-Thyroglobulin II (ATgII)- Ensaio Para a Detecção de Autoanticorpos Antitiroglobulina.; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=688535>.
106. Healthineers S. Antiperoxidase Tireoideia (ATPO).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=628041>.
107. Healthineers S. Cálcio (Ca).; 2017. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=378171>.
108. Healthineers S. Fósforo Inorgânico (IP).; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=743204>.
109. Healthineers S. Magnésio (Mg).; 2019. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=677095>.
110. Healthineers S. Hormona Paratireoideia Intacta (PTH).; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=766409>.
111. Healthineers S. Calcitonina (CALCT).; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=719255>.
112. ICAP. ICAP- International Consensus on ANA Patterns. <https://www.anapatterns.org/index.php>. Published 2015. Accessed September 22, 2020.
113. Drees JC, Wu AHB. Analytical Techniques. In: Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE, eds. Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations. 6a. Wolters Kluwer / Lippincott Williams and Wilkins; 2010:130-141.
114. Healthineers S. Atellica IM Analyzers.; 2019.
115. Healthineers S. Tiroxina Livre (FT4).; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=767006>.
116. Healthineers S. Triiodotironina Livre (FT3).; 2020. <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=760062>.

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**USO DE DRIED BLOOD SPOTS (DBS) COMO AMOSTRA NO DIAGNÓSTICO E  
MONITORIZAÇÃO DE INFEÇÕES VIRAIS**

Mariana Isabel Rebola Teles

Relatório de Estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**2021**

## Resumo

Atualmente, o diagnóstico clínico e vigilância de um indivíduo depende, sobretudo, da recolha de sangue através de punção venosa. Muitas das vezes, esse tipo de procedimento não é bem aceite pelo utente devido ao desconforto que lhe é provocado. Para além disso, a colheita de sangue venoso deve reger-se por protocolos de qualidade que garantam a mitigação de fontes de variabilidade que podem comprometer o resultado obtido. Surgem novos métodos laboratoriais que têm como objetivo simplificar o processo de diagnóstico e monitorização, dos quais os *dried blood spots*.

Os *dried blood spots* são um método de análise em que é realizada uma punção do dedo, calcanhar ou orelha do utente, sendo obtida uma amostra de sangue capilar. A amostra obtida é colocada num cartão de papel de filtro, armazenada sob condições específicas e depois analisada. A sua utilização principal é no rastreio neonatal, onde são investigados possíveis distúrbios metabólicos. Contudo, este método pode ser utilizado a nível laboratorial para diagnóstico e monitorização de infeções virais tal como o vírus da Imunodeficiência Humana, Hepatites B e C, Citomegalovírus, entre outros. Neste tipo de análise, é medido o título de anticorpos, antigénios ou ácidos nucleicos presentes na gota de sangue obtida, podendo ser diagnosticada uma infeção viral recente ou remeter para uma infeção antiga.

Este método apresenta-se vantajoso em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico, sendo bastante promissor em áreas em que a monitorização e rastreio de populações é de difícil acesso e onde os recursos de saúde são limitados.

No presente trabalho, é feita uma revisão acerca das vantagens e desvantagens dos *dried blood spots*, das fontes de variabilidade que se podem verificar na utilização do referido método, da sua contribuição no diagnóstico e monitorização de infeções virais assim como a sua importância em condições de saúde remotas.

**Palavras-Chave:** *Dried Blood Spots*, Infeção Viral, Diagnóstico, Anticorpos, Ácidos Nucleicos, Punção Capilar

## Abstract

Currently, the clinical diagnosis and surveillance of an individual depends mainly on blood collection through venous puncture. Often, this type of procedure is not well accepted by the user due to the discomfort caused to him. In addition, venous blood collection should be governed by quality protocols that ensure the mitigation of sources of variability that may compromise the result. New laboratory methods emerge that aim to simplify the process of diagnosis and monitoring, of which dried blood spots.

Dried blood spots are a method of analysis in which a puncture of the user's finger, heel or ear is performed, and a capillary blood sample is obtained. Its main use is in neonatal screening, where possible metabolic disorders are investigated. However, this method can be used at laboratory level for the diagnosis and monitoring of viral infections such as human immunodeficiency virus, hepatitis B and C, cytomegalovirus, among others. In this type of analysis, the titer of antibodies, antigens or nucleic acids present in the blood drop obtained is measured, a recent viral infection or an old infection may be diagnosed.

This method is advantageous in relation to traditional diagnostic methods, being very promising in areas where monitoring and screening of populations is difficult to access and where health resources are limited.

In the present work, a review is made about the advantages and disadvantages of dried blood spots, sources of variability that can be seen in the use of this method, its contribution to the diagnosis and monitoring of viral infections, as well as its importance in remote health conditions.

**Key-words:** Dried Blood Spots, Viral Infection, Diagnosis, Antibodies, Nucleic Acids, Capillary Puncture

# Índice

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Origem e Utilização no Passado</b> .....	<b>2</b>
<b>Amostras Utilizadas pela Técnica de DBS</b> .....	<b>3</b>
Deteção de Ácidos Nucleicos e Anticorpos.....	4
<b>Vantagens e Desvantagens dos <i>Dried Blood Spots</i></b> .....	<b>5</b>
<b>Colheita, Armazenamento, Transporte e Processamento de Amostras</b> .....	<b>6</b>
Colheita da Amostra .....	6
Processamento e Secagem da Amostra .....	6
Armazenamento e Transporte da Amostra .....	8
Tratamento e Análise da Amostra .....	8
<b>Fontes de Variabilidade na Análise</b> .....	<b>9</b>
Tipo de Cartão de Filtro .....	9
Abundância do Analito em Sangue Capilar VS Sangue Venoso .....	10
Hematócrito .....	10
Condições de Armazenamento .....	11
Diferenças Interindividuais .....	12
<b>Validação dos <i>Dried Blood Spots</i></b> .....	<b>13</b>
<b>Diagnóstico e Monitorização de Infeções Virais</b> .....	<b>14</b>
Citomegalovírus.....	15
Vírus Herpes Simplex.....	16
Vírus da Imunodeficiência Humana .....	18
Vírus das Hepatites B e C .....	21
Vírus da Hepatite B.....	21
Vírus da Hepatite C .....	23
Vírus do Sarampo e da Rubéola .....	25
Vírus do Sarampo.....	26
Vírus da Rubéola .....	28
Vírus do Dengue.....	30
<b>Considerações Éticas na Utilização dos <i>Dried Blood Spots</i></b> .....	<b>33</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>36</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>38</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Preparação e processamento de <i>Dried Blood Spots</i> .....	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b> Exemplo de Boas e Más Colheitas de <i>Dried Blood Spots</i> .....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Tratamento e Análise de <i>Dried Blood Spots</i> .....	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Influência do Hematócrito dos <i>Dried Blood Spots</i> .....	<b>11</b>
<b>Figura 5.</b> Padrão serológico observado, usualmente, na hepatite B .....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Decurso de uma infecção crónica por hepatite C .....	<b>24</b>

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Incidência das infecções por HIV e tratamento em 2020. ....	<b>19</b>
<b>Gráfico 2.</b> Número de casos de sarampo reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de janeiro a agosto de 2021 em África, América e Europa. ....	<b>26</b>
<b>Gráfico 3.</b> Número de casos de rubéola reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de janeiro a agosto de 2021 em África, América e Europa. ....	<b>28</b>
<b>Gráfico 4.</b> Número de testes laboratoriais de deteção de IgM específica de sarampo e rubéola realizados em 2021 pela Organização Mundial de Saúde (OMS). ....	<b>29</b>
<b>Gráfico 5.</b> Casos de Dengue notificados na Europa entre 2010 e 2019. ....	<b>30</b>
<b>Gráfico 6.</b> Resultados do Programa Nacional de Rastreio Neonatal em 2019. ....	<b>33</b>

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>DBS</b>	<i>Dried Blood Spots</i>
<b>DENV</b>	Vírus do Dengue
<b>DMS</b>	Dried Matrix Spots
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dsDNA</b>	DNA de cadeia dupla
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>gG</b>	Glicoproteína G
<b>gG1</b>	Glicoproteína G1
<b>gG2</b>	Glicoproteína G2
<b>HBV</b>	Vírus da Hepatite B
<b>HCB</b>	Hepatite Crônica B
<b>HCC</b>	Hepatite Crônica C
<b>HCT</b>	Hematócrito
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HIV-1</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1
<b>HIV-2</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2
<b>HSV</b>	Vírus Herpes Simplex
<b>HSV-1</b>	Vírus Herpes Simplex do Tipo 1
<b>HSV-2</b>	Vírus Herpes Simplex do Tipo 2
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PNRN</b>	Programa Nacional de Rasteio Neonatal
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-qPCR</b>	<i>Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>ssRNA</b>	RNA de cadeia simples
<b>VPP</b>	Valor Preditivo Positivo

[Página intencionalmente deixada em branco]

## Introdução

Os *Dried blood spots* (DBS) são um método que tem por base a deposição de algumas gotas de sangue, obtidas por punção do dedo, num cartão de papel de filtro. As amostras obtidas secam ao ar sem qualquer outro processamento, sendo armazenadas sob condições específicas. <sup>1</sup>

Apresenta-se como um método bastante promissor devido à sua enorme utilidade tanto na presença de condições ótimas de diagnóstico como na ausência das mesmas. Em condições precárias de saúde e onde existem poucos recursos, muitas das vezes, existe a dificuldade no processamento de sangue assim como no seu armazenamento sendo os DBS um meio potencialmente útil e barato para superar essas mesmas dificuldades. <sup>2</sup>

O teste de DBS é essencialmente utilizado no diagnóstico pré-natal de distúrbios metabólicos em recém-nascidos. Contudo, é cada vez mais utilizado em testes de diagnóstico de várias infecções virais como o Sarampo, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Hepatite C (HCV) e Poliomielite. <sup>3</sup>

A utilização dos *Dried blood spots* aplica-se, principalmente, a duas áreas: área clínica e área de investigação e de estudos de vigilância epidemiológica. No contexto clínico, o principal objetivo é analisar dados de diagnóstico relacionados com a saúde de modo a estratificar indivíduos em risco para testes confirmatórios adicionais ou para tratamentos individuais ou populacionais. No contexto de investigação, o objetivo é estender a vigilância epidemiológica que monitoriza o nível populacional de transmissão da infecção assim como rastrear doenças emergentes. <sup>4</sup>

## Origem e Utilização no Passado

O conceito de depósito de sangue proveniente de punção do dedo em papel de filtro laboratorial, o precursor dos DBS, foi descrito pela primeira vez em 1860 para a medição dos níveis de glucose e em 1960 para a monitorização de distúrbios metabólicos em recém-nascidos cujo sangue foi obtido por punção do calcanhar. <sup>4</sup>

A utilização de amostras de sangue em papel é referida em vários momentos da história, nomeadamente, em várias ilustrações como no mural Mayan de Bonampak, no México, datado de 780 D.C.. Porém, Christian Bang foi o primeiro a receber crédito pela utilização deste método analítico em 1913, estabelecendo um protocolo de absorção de sangue num papel de filtro, secagem e posterior determinação da concentração de glucose. <sup>5</sup>

Em 1924, Chapman conduziu uma investigação em que observou se o sangue de doentes poderia ser colhido em papel de filtro, seco e depois utilizado num teste de fixação do complemento para a sífilis. Este investigador procedeu à utilização dos DBS por ser necessária uma reduzida quantidade de sangue, pelo riscos de contaminação e de hemólise poderem ser eliminados e pelo facto de se poder preservar a amostra por longos períodos com baixa deterioração. <sup>5</sup>

O conceito de *Dried Blood Spot* é conhecido, atualmente, devido à contribuição de Robert Guthrie que, no ano de 1961, relatou um ensaio de inibição bacteriana para medir a fenilalanina de modo a detetar a presença de fenilcetonúria. Vários são os autores que atribuem a Guthrie a primeira utilização dos DBS, sendo os cartões utilizados denominados de “Cartões de Guthrie”. <sup>5</sup>

## Amostras Utilizadas pela Técnica de DBS

Ao longo do tempo, o número de analitos analisados utilizando a técnica de DBS tem vindo a aumentar. A amostra mais comumente utilizada é sangue total, no entanto, com o aumento da procura da referida técnica surge a adaptação da mesma a outros tipos de fluidos biológicos. São eles a urina, originando os *Dried Urine Spots* (DUS), o líquido cérebrospinal, o líquido amniótico e a saliva. Às amostras biológicas depositadas e secas num papel de filtro atribui-se o nome genérico de *Dried Matrix Spots* (DMS).<sup>6</sup>

A principal vantagem dos DBS é o volume reduzido de amostra necessário à análise, o que facilita de forma considerável o diagnóstico e monitorização de determinadas patologias em locais onde as condições de saúde são bastante precárias. Esta vantagem é bastante útil no caso particular do sangue total.

A colheita de sangue por punção venosa é o método, geralmente, mais utilizado para o estudo dos mais diversos parâmetros. Porém, é uma técnica de alguma complexidade exigindo pessoal altamente qualificado para a execução da mesma. Provoca, muitas das vezes, algum desconforto no utente e pode adulterar os resultados se não for executada segundo as normas estabelecidas. Os *Dried Blood Spots* são assim uma alternativa à punção venosa.

O sangue total é a amostra onde está presente a maioria dos analitos sendo a mais utilizada nos DBS para todos os tipos de testes, particularmente, em testes serológicos e de monitorização da carga viral. Contudo, existem muitas outras como a urina e saliva, que permitem a aplicação de métodos totalmente não invasivos. São utilizadas na medição de um conjunto biomarcadores que se encontra nestes líquidos biológicos como o cortisol e as catecolaminas.<sup>6,7</sup>

A saliva é considerada um “ultrafiltrado” do sangue e uma potencial fonte de informação clínica visto que os biomarcadores salivares podem refletir o estado patológico do utente. A análise desta amostra é, atualmente, considerada como uma possível substituta do sangue, especialmente para a monitorização a longo prazo de terapêuticas medicamentosas.<sup>8</sup>

A urina é outro espécime que pode ser colhida de forma não invasiva, podendo ser utilizada em estudos populacionais a nível toxicológico. Contudo, embora a urina e saliva sejam amostras de fácil recolha, podendo a mesma ser efetuada pelo próprio utente, nem todos os analitos podem ser medidos nestes líquidos biológicos.<sup>9</sup>

Os líquidos cérebroespinal e amniótico são também utilizados, mas as vantagens da sua utilização não são tão evidentes face às amostras anteriormente referidas. São amostras de difícil obtenção e requerem a intervenção de pessoal médico especializado.<sup>6</sup>

### **Deteção de Ácidos Nucleicos e Anticorpos**

Como referido anteriormente na presente monografia, os *Dried Blood Spots* são utilizados, principalmente, na monitorização de recém-nascidos. Porém, devido à facilidade de colheita, armazenamento e transporte das amostras colhidas através deste método, muitos foram os cientistas que se interessaram pelo mesmo. Sendo assim, os DBS foram aplicados noutras áreas, como na monitorização de infeções virais e infeções parasitológicas.<sup>5</sup>

No diagnóstico e monitorização de infeções virais, os principais analitos a detetar são ácidos nucleicos e anticorpos. Podem ser realizados dois tipos de testes: testes onde é testada a presença de DNA ou RNA viral e testes serológicos onde são avaliados os anticorpos IgM e IgG de modo a averiguar se se trata de uma primoinfeção ou infeção antiga.

As técnicas mais utilizadas para avaliar os analitos acima referidos são a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) que faz a amplificação das cadeias de DNA presentes na amostra, *Quantitative Reverse Transcription PCR* (RT-qPCR) utilizada quando o material de iniciação é RNA, e a técnica de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) que quantifica anticorpos específicos para proteínas de vírus.<sup>10,11</sup>

A utilização das técnicas acima referidas é, muitas das vezes, feita em conjunto. Por exemplo, no diagnóstico da infeção pré-natal por Citomegalovírus (CMV) onde é importante testar a presença de anticorpos IgM e IgG, assim como a concretização do teste de PCR. Isto deve-se ao facto de o doseamento dos anticorpos necessitar de uma atenção especial devido à permanência da IgM em circulação durante um longo período e da IgG poder ser de origem materna. Assim, a realização do teste de PCR é extremamente importante para deteção do genoma do vírus em estudo.<sup>12</sup>

## Vantagens e Desvantagens da sua Utilização

Os *Dried Blood Spots* são cada vez mais utilizados no diagnóstico e monitorização de determinadas patologias assim como no controlo das respetivas terapêuticas. Como em todas as técnicas, muitas são as vantagens e as desvantagens associadas à sua aplicação.

A referida técnica é empregue, na maioria das vezes, em substituição da punção venosa. Em relação a esta, a amostragem pela técnica de DBS é bastante menos invasiva, dolorosa e o volume de sangue necessário é menor. Para além disso, permite a recolha da amostra pelo próprio paciente, o que é benéfico na monitorização da terapia medicamentosa. É também vantajoso no caso particular de crianças e idosos, em que a punção venosa pode ser particularmente problemática.<sup>7,13</sup>

Ao contrário do que acontece com o plasma e soro, as amostras de DBS não necessitam de ser centrifugadas, separadas ou imediatamente refrigeradas após a colheita. A maioria dos analitos permanece estável à temperatura ambiente por mais de uma semana, conferindo uma flexibilidade considerável nos procedimentos de colheita e transporte.<sup>7</sup>

Outra das vantagens deste procedimento, é a diminuição do risco de infeção. Contudo, é importante saber que alguns agentes patogénicos sobrevivem durante longos períodos no papel de filtro, devendo a manipulação e transporte da amostra serem efetuados segundo as boas normas laboratoriais.<sup>5</sup>

Porém, os DBS apresentam também desvantagens analíticas. A maioria dos protocolos laboratoriais requerem soro ou plasma, o que significa que devem ser desenvolvidos protocolos adaptados aos DBS de modo a validar a exatidão, precisão, confiabilidade e os limites de deteção.<sup>7</sup>

É importante referir que o sangue obtido se trata de sangue capilar, ou seja, uma mistura de sangue arterial, sangue venoso e de fluidos intersticiais. Isto indica que os resultados obtidos poderão não ser comparáveis com aqueles obtidos para amostras de soro ou plasma.<sup>7,13</sup>

Por fim, existem parâmetros que podem interferir com os resultados obtidos por DBS, como o volume, humidade, hematócrito, local de punção e as características do papel de filtro utilizado. Os fatores referidos podem interferir, quantitativamente, no analito em estudo o que poderá alterar os resultados obtidos. Contudo, os mesmos podem também adulterar os resultados em sangue total obtido por punção venosa.<sup>5</sup>

## **Colheita, Armazenamento, Transporte e Processamento de Amostras**

A preparação de *Dried Blood Spots* numa matriz de papel de filtro apresenta critérios específicos para a colheita, armazenamento e transporte. O cartão utilizado para a colheita de sangue total deve estar aprovado pela entidade reguladora. Contudo, a utilização de papel de filtro está associada a um certo nível de imprecisão, o que significa que todo o processo de colheita deve estar estandardizado de modo a minimizar possíveis variações.<sup>5</sup>

### **Colheita da Amostra**

Antes de se proceder à colheita da amostra de sangue deve verificar-se que todo o material necessário à mesma se encontre disponível. De seguida, o operador que realizará a colheita deverá colocar o equipamento de proteção individual de modo a assegurar a sua segurança assim como a do utente. As medidas de proteção são deveras importantes na prevenção da infeção por possíveis agentes patogénicos presentes na amostra a recolher, visto que todo o sangue humano é considerado potencialmente infeccioso para o HIV, vírus das hepatites B e C, entre outros.<sup>5</sup>

É realizada a identificação do utente. Após a identificação, o utente deve aquecer as suas mãos. O dedo a ser puncionado deverá ser massajado de forma anterógrada de modo a aumentar o fluxo sanguíneo. Seguidamente, procede-se à limpeza da pele no lado palmar da falange distal do terceiro ou quarto dedo da mão que não escreve com recurso a um desinfetante adequado como, por exemplo, álcool isopropílico a 70%.<sup>14</sup>

### **Processamento e Secagem da Amostra**

Em primeiro lugar, o dedo deve estar numa posição em que a gravidade facilite a colheita do sangue. O mesmo deve ser puncionado com uma lanceta de uso único. A primeira gota deve ser descartada com recurso a uma gaze estéril devido à presença dos líquidos intersticial e intercelular que podem contaminar a amostra. A segunda gota é transferida para um dos círculos impressos no papel de filtro evitando o contacto do dedo com o cartão. O procedimento deve ser repetido até o número de círculos necessário estar preenchido.<sup>7,14,15</sup>

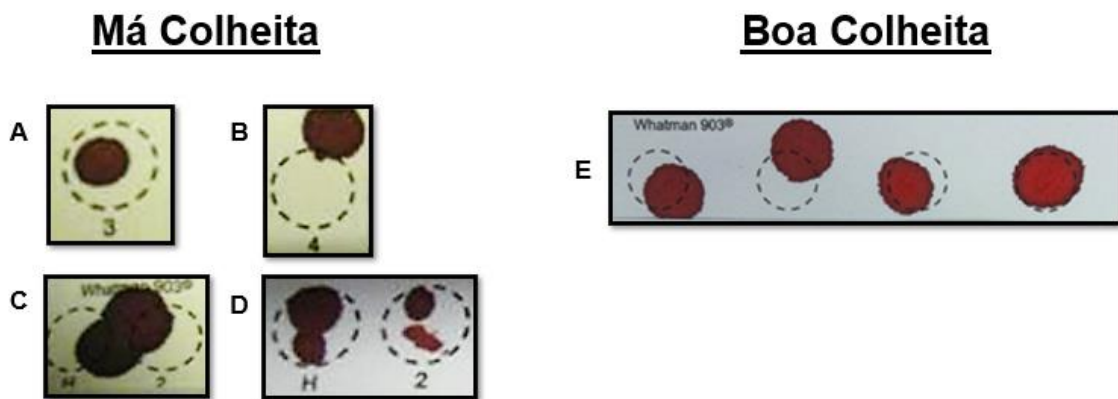
A secagem da amostra decorre da colocação do cartão de filtro numa toalha de papel limpa num gabinete de segurança de risco biológico à temperatura ambiente na ausência de qualquer fonte externa de calor. As amostras devem secar durante um período de quatro

horas ou durante a noite. Quando o processo de secagem está completo, os DBS apresentam uma cor castanho-escuro sem quaisquer áreas vermelhas visíveis. <sup>7,14</sup>



**Figura 1. Preparação e processamento de Dried Blood Spots.** Obtenção de sangue capilar por punção da pele através de uma lanceta (A). Transferência da amostra para os vários círculos impressos no cartão utilizado (B, C). As amostras devem secar à temperatura ambiente em condições de segurança de forma a adquirirem o aspeto apresentado em (D).

(Adaptado de: Grüner et al., 2015)



**Figura 2. Exemplo de Boas e Más Colheitas de Dried Blood Spots.** Observa-se à esquerda os resultados de uma má colheita. Em (A), a gota de sangue é demasiado pequena não preenchendo o círculo impresso na sua totalidade. Em (B), a amostra encontra-se fora da área designada. Em (C) e (D) verifica-se a sobreposição de duas gotas. À direita, em (E) encontra-se o resultado de uma boa colheita.

(Adaptado de: “Dried Blood Spot Collection of Health Biomarkers to Maximize Participation in Population Studies”, 2014)

## **Armazenamento e Transporte da Amostra**

Os *Dried Blood Spots* devem ser empacotados em recipientes com baixa permeabilidade a gases garantindo o intercâmbio de ar. O saco onde são colocadas as amostras deve conter uma a duas saquetas dessecantes com o objetivo de as proteger da humidade. Opcionalmente, pode ser adicionado um indicador de humidade. O contacto entre amostras deve ser evitado, minimizando o risco de contaminação cruzada e permitindo o armazenamento dos DBS para estudos posteriores. <sup>7,14</sup>

O recipiente deve ser transferido para um congelador a uma temperatura de -20°C ou mais baixa o mais rápido possível. Sob recursos limitados, as amostras devem ser armazenadas a -4°C ou à temperatura ambiente apresentando uma fiabilidade de catorze dias. É importante referir a relevância destas medidas porque a temperaturas e em condições de humidade elevadas a degradação dos analitos é acelerada. <sup>7,14</sup>

O transporte das amostras congeladas deve ser realizado em gelo seco. Por outro lado, para cartões de filtro mantidos à temperatura ambiente é utilizado um sistema triplo de armazenamento. Este sistema consiste num saco com fecho de correr como recipiente interior, assim como um envelope interior e exterior. O envelope pode ser enviado pelo correio normal sendo que no contentor primário deve ser colocado o símbolo de risco biológico internacional. O sistema de contenção utilizado impede a exposição a possíveis agentes patogénicos e mantém a integridade da amostra. <sup>5,14</sup>

## **Tratamento e Análise da Amostra**

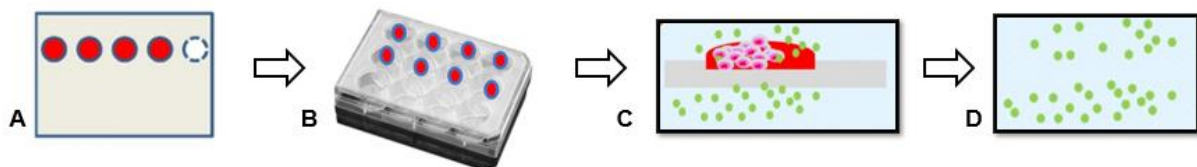
A qualidade das amostras recebidas no laboratório deve ser avaliada previamente, devendo ser registado o grau de integridade da embalagem, as condições dos dessecantes assim como o indicador de humidade. <sup>16</sup>

Segundo Grüner et al. , cada um dos círculos deve ser puncionado por um dispositivo de utilização única de 6 mm. Todos os DBS puncionados de um único paciente devem ser transferidos para uma placa de doze poços. Seguidamente, é colocada um solução salina de tampão fosfato contendo 0,05% de Tween 20 e 0,08% de azida de sódio. O volume de tampão deve ser adaptado à análise que se pretende realizar.

A placa de cultura celular é colocada num agitador e os DBS são eluídos durante cerca de quatro horas. No dia seguinte, os DBS estão praticamente livres de sangue e formaram-se sobrenadantes hemolíticos que são colocados em tubos de microcentrífuga. Os microtubos são centrifugados de modo a libertar os sobrenadantes obtidos de detritos formados durante

a eluição. Por fim, os eluídos obtidos estão prontos para análise sendo procurados marcadores para os mais diversos vírus, como o vírus das hepatites B e C, e HIV. <sup>14</sup>

No entanto, o protocolo de eluição dos DBS depende do analito que se pretende extrair e analisar. Sendo assim, o processo de análise deverá ser adaptado ao analito em questão.



**Figura 3. Tratamento e Análise de Dried Blood Spots.** Punção dos vários círculos impressos no papel de filtro (A). Transferência dos círculos para uma placa de doze poços (B). Adição de solução salina de tampão fosfato (C). A placa é colocada num agitador e os DBS são eluídos durante quatro horas. Após a centrifugação dos eluídos com o objetivo de remover os detritos presentes, é obtida uma solução onde é possível encontrar os vírus livres (D).

(Adaptado de: Wu et al., 2015)

## Fontes de Variabilidade na Análise

### Tipo de cartão de filtro utilizado

Estão disponíveis no mercado vários formatos de cartões utilizados na execução de DBS. Estes apresentam uma grande eficiência e estabilidade de extração para grupos específicos de analitos. Para uma análise em particular, a escolha do cartão deve recair nas propriedades do analito a estudar assim como nos seus requisitos de estabilização, eficiência de extração e método de análise. <sup>4</sup>

Segundo alguns estudos efetuados, nomeadamente por Guthrie, o tipo de cartão de filtro influencia bastante os resultados obtidos. Verificou-se que a absorção da amostra diferia entre os vários tipos de cartões disponíveis. É então de extrema importância assegurar a qualidade do papel utilizado, de modo a garantir a fiabilidade dos resultados. <sup>5</sup>

É importante referir que muitas são as fontes de variabilidade que dependem da qualidade do cartão de filtro utilizado como, por exemplo, o impacto do hematócrito e a concentração de determinados analitos. <sup>4</sup>

## **Abundância do Analito em Sangue Capilar VS Sangue Venoso**

Entre o sangue capilar, utilizado na obtenção de DBS, e o sangue venoso existem diferenças no que toca à abundância de determinados analitos. De um modo geral, as amostras obtidas a partir de sangue capilar parecem apresentar uma concentração menor quando comparadas com sangue venoso. Este facto pode dar origem a resultados falsos-negativos também devido ao volume diminuto que é obtido através de punção da pele. <sup>4,18</sup>

Elevadas concentrações de alguns dos analitos em sangue capilar podem ser atribuídas a efeitos de hemoconcentração ou, por outro lado, as baixas concentrações podem dever-se à presença de fluido extracelular.<sup>4</sup>

Devido a estas diferenças que por vezes podem ser significativas nos resultados obtidos, é extremamente importante estabelecer valores de referência para essas mesmas amostras. Contudo, na prática clínica os resultados obtidos para sangue capilar são comparados com valores de referência estabelecidos para sangue venoso. <sup>15</sup>

### **Hematócrito**

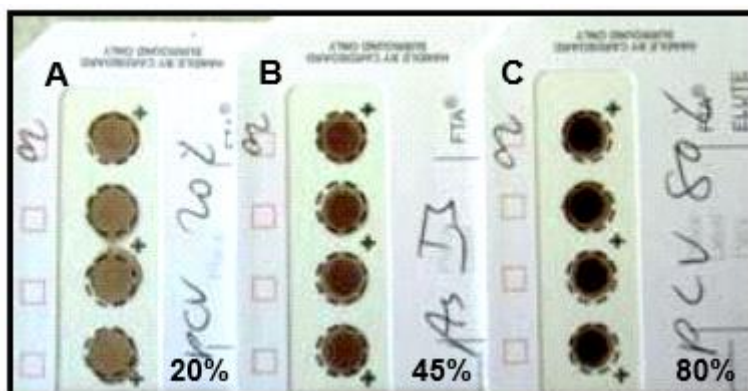
A principal fonte de variabilidade associada à técnica de DBS referida pela literatura é o Hematócrito (HCT). Este parâmetro representa a percentagem de eritrócitos presentes num determinado volume de sangue. O HCT apresenta uma vasta gama de valores normais e pode variar com o género, idade, meio ambiente, e estado geral de saúde. <sup>4,19</sup>

A capacidade de disseminação de uma gota de sangue pelo papel de filtro e, por conseguinte, o diâmetro do ponto obtido são influenciados pela viscosidade do sangue que, por sua vez, é influenciada pelo HCT. Assim sendo, uma amostra de sangue com um HCT baixo resulta num DBS de maiores dimensões quando comparado com um HCT elevado. Este facto pode afetar, de modo significativo, a quantidade de analito que é possível extrair recorrendo à punção do cartão de DBS o que afeta diretamente os resultados obtidos. <sup>20</sup>

O Hematócrito influencia igualmente o tempo de absorção da amostra no papel de filtro utilizado, assim como o aspeto obtido. Uma menor concentração de eritrócitos origina um bordo mais uniforme e liso, enquanto um sangue mais viscoso provoca um contorno mais irregular. <sup>21</sup>

A consideração deste parâmetro como uma fonte de variabilidade é bastante importante, porque pode afetar o diagnóstico que é dado. No caso de um indivíduo que apresente valores

de HCT desviantes, os valores de determinado analito podem aumentar ou diminuir significativamente o que pode originar resultados falsos-positivos ou falsos-negativos.<sup>22</sup>



**Figura 4. Influência do Hematócrito na forma dos *Dried Blood Spots*.** De (A) a (C) verifica-se um aumento crescente dos valores de hematócrito. É possível concluir que quanto maior o valor de HCT maior a viscosidade sanguínea e, por consequência, maior a irregularidade da forma obtida.

(Adaptado de: "The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs", 2010)

### Condições de Armazenamento

O impacto das condições de armazenamento na qualidade dos dados obtidos tem vindo a ser avaliado com foco no tipo de cartão, tempo, temperatura, humidade e métodos de armazenamento. O efeito destes parâmetros é dependente das propriedades do analito em estudo e do DBS.<sup>4</sup>

As principais fontes de variabilidade observadas nas condições de armazenamento são a humidade e a temperatura, sobre as quais têm sido efetuados os mais diversos estudos de modo a entender qual a relação entre as mesmas e a estabilidade dos biomarcadores presentes na amostra de DBS.<sup>23</sup>

A humidade é um fator bastante relevante na forma como o sangue se dissemina pelo papel de filtro, como a amostra seca e no modo em que se analisa a estabilidade do analito presente no DBS. Segundo alguns estudos em que se observa a degradação de diversas amostras, verifica-se que a maioria dos analitos se degrada devido à humidade alta, enquanto as restantes se deterioram devido ao armazenamento a 37°C. Posto isto, os biomarcadores variam em grau e rapidez de degradação durante o armazenamento devido a baixos e altos níveis de humidade, assim como devido a temperaturas elevadas.<sup>5</sup>

Contudo, as baixas temperaturas podem também afetar a estabilidade do analito, como é caso dos biobancos. Por exemplo, na medição da carga viral de HIV, os DBS devem ser armazenados a -20°C ou à temperatura ambiente durante catorze dias. Mesmo se conservados a -20°C, a amostra só é viável se as medições forem efetuadas num período de dois anos. <sup>4</sup>

### **Diferenças Interindividuais**

Para além de todas as fontes de variabilidade apresentadas anteriormente, é importante referir o papel que apresentam as diferenças interindividuais na análise dos DBS. Essas diferenças assentam, principalmente, na idade, sexo e ocupação profissional do indivíduo submetido à análise.

Num estudo realizado na China, onde foram recolhidas amostras de indivíduos com idade compreendida entre os zero e os quarenta e nove anos, o objetivo era comparar o número de DBS colhidos em diferentes grupos demográficos. No referido artigo científico, foi contabilizado o número de DBS adequados à deteção de anticorpos IgG para o vírus do Sarampo. Foram tidos em conta as variáveis idade, sexo, urbanidade, entre outras. <sup>3</sup>

Em relação à idade, é possível concluir que quanto mais novo o indivíduo maior é a percentagem de DBS não adequados, o que significa que a colheita do produto biológico apresenta maior dificuldade em crianças do que em adultos. <sup>3</sup>

No que toca ao sexo do indivíduo, as diferenças verificadas entre ambos os sexos devem-se, principalmente, à espessura epidérmica que é menor na mulher o que influencia a qualidade da colheita. O mesmo princípio se aplica à ocupação profissional, onde se observa nos trabalhadores manuais uma maior incidência de calos do que em outros trabalhadores. <sup>3</sup>

É relevante referir que, ao longo do estudo, a qualidade dos DBS obtidos variou também com a estação do ano em que foi realizada a colheita, verificando-se uma diminuição nos meses frios devida à constrição vascular. <sup>3</sup>

## **Validação dos *Dried Blood Spots***

A validação analítica do método quantitativo de DBS deve ser conduzida de acordo com as diretrizes da FDA e da EMA (*European Medicines Agency*) como base para as boas normas laboratoriais e devido ao consenso comum destas orientações para a harmonização global da validação de métodos. <sup>13</sup>

Segundo as diretrizes da FDA <sup>24</sup>, o desenvolvimento de um método analítico envolve a otimização de procedimentos e de condições de extração e detecção de um determinado analito. Para além disso, envolve também a otimização de alguns parâmetros bioanalíticos como a seletividade, exatidão, precisão, calibração, curva padrão, recuperação e estabilidade do analito. <sup>13</sup>

A seletividade é o parâmetro que determina a capacidade de quantificação do analito de interesse na presença de substâncias potencialmente interferentes como metabolitos e produtos de degradação. <sup>13,24</sup>

A exatidão de um método analítico descreve a proximidade do valor obtido à concentração nominal do analito em cada calibração ou na amostra de controlo de qualidade. <sup>13,25</sup> A precisão consiste na dispersão dos resultados das várias medições, sendo definida como o desvio-padrão da média de resultados. <sup>13</sup>

A curva padrão de calibração é a base para a quantificação de amostras desconhecidas e deve ser preparada na mesma matriz biológica das amostras de estudo, neste caso em particular, em papel de filtro. Para elaboração da curva, deve ser utilizado um mínimo de seis concentrações diferentes juntamente com um branco de amostra, com ausência de padrão interno, e uma amostra zero processada com padrão interno. <sup>13,25</sup>

A evolução da estabilidade deve ser acompanhada assegurando que cada passo durante a preparação da amostra e a sua consequente análise, assim como as condições de armazenamento não afetam a concentração do analito. <sup>25</sup>

Contudo, a validação dos DBS é influenciada por diversos parâmetros que não são abrangidos pelas diretrizes da FDA ou EMA. Por exemplo, a estabilidade e recuperação do analito nesta técnica têm de ser ajustadas devido à influência de outros parâmetros, como o hematócrito. Para além disso, o facto de as condições de expedição não necessitarem de qualquer tipo de refrigeração leva a que sejam necessários estudos de estabilidade complementares de modo a estudar a influência da temperatura e da iluminação, por exemplo.

Como referido anteriormente, o hematócrito é um parâmetro analítico que influencia os resultados obtidos pela técnica de DBS. Afeta, de certo modo, a exatidão e a precisão do cálculo da concentração de um determinado analito. Para validar o método na presença desta fonte de variabilidade, o analista deve ter acesso a valores previstos de hematócrito e, no momento da análise, aos valores reais desse parâmetro ou limites de valores das amostras em estudo.<sup>26</sup>

A homogeneidade da amostra de sangue é também influenciada pelo hematócrito assim como pelo tipo de cartão utilizado, o que significa que a exatidão e a precisão do método são afetadas de modo que não se enquadrem nos critérios de aceitação regulamentados.<sup>26</sup>

Em suma, na validação e utilização dos *Dried Blood Spots* é essencial fazer um balanço das diversas vantagens do método, como o conforto do paciente e a facilidade de colheita, de modo a compensar estes requisitos analíticos.<sup>26</sup> É também importante recorrer a procedimentos de mitigação das várias fontes de variabilidade contribuindo para fiabilidade do método e, por consequência, dos resultados obtidos.

## **Diagnóstico e Monitorização de Infeções Virais**

O método de DBS tem vindo a ser considerado bastante vantajoso em relação a outras técnicas classicamente utilizadas, como a punção venosa. Para além de todas as vantagens referidas, esta técnica é também bastante vantajosa no diagnóstico e monitorização de infeções virais.

Os DBS apresentam um baixo risco de contágio de alguns vírus como o HIV-1 e -2, e HCV que são conhecidos por estarem presentes no soro ou plasma perdendo infecciosidade devido à rutura do seu invólucro na secagem. Contudo, elevados títulos de vírus permanecem viáveis em superfícies por vários dias, como é exemplo o vírus da Hepatite B (HBV) que pode permanecer viável durante sete dias. É por isso que a referida técnica é cada vez mais utilizada, pela minimização dos riscos associados à manipulação de amostras possivelmente infecciosas.<sup>27</sup>

## Citomegalovírus

O CMV pertence à família *Herpesviridae* que engloba vírus com genoma a dsDNA. Foram isolados mais de cem vírus pertencentes a este grupo em vários hospedeiros, dos quais mamíferos, pássaros, peixes, répteis e anfíbios. Oito destes vírus são vírus humanos.<sup>28</sup>

Uma das principais características desta família é que, uma vez infetado o hospedeiro, os vírus permanecem como infeções persistentes para o resto da vida do mesmo. Este tipo de infeções classifica-se como latente, podendo ser reativadas de tempo a tempo, especialmente se o hospedeiro estiver imunocomprometido.<sup>28</sup>

Este vírus pode ser transmitido da mãe ao feto a qualquer momento durante a gestação e é a causa mais comum de infeção viral congénita, contribuindo para a mortalidade infantil e deficiências permanentes como a perda auditiva, deficiência visual e retardamento mental.<sup>29</sup> Uma identificação precoce das crianças infetadas, através do rastreio neonatal, permite um rápido tratamento com o objetivo de limitar a progressão da perda auditiva prevenindo o surgimento de danos ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC), tanto em bebés sintomáticos como assintomáticos.<sup>30</sup>

O diagnóstico da infeção congénita por CMV pode ser alcançado através da análise de amostras de saliva e urina recolhidas nas primeiras duas a três semanas de vida. Após esse período, é possível distinguir entre uma infeção congénita e uma infeção adquirida posteriormente.<sup>30</sup>

A extração e amplificação de DNA viral a partir de DBS recolhidos de crianças nos seus primeiros dias de vida, com o objetivo de monitorização de distúrbios genéticos e metabólicos, foi proposta como uma alternativa útil para o isolamento de HIV em crianças seropositivas.<sup>31</sup>

A deteção de CMV em DBS é realizada através de testes serológicos onde é detetada a presença dos anticorpos IgM e IgG, e de testes de deteção do DNA viral. A deteção dos anticorpos permite distinguir uma infeção congénita de uma infeção adquirida posteriormente, por exemplo, durante o parto. A deteção do genoma viral permite confirmar a presença do vírus.

Segundo um estudo realizado por Kharrazi et al.<sup>29</sup>, onde foi analisada a prevalência de infeções congénitas por CMV através da medição da carga viral em DBS arquivados, é possível observar todo o processo de deteção da presença deste vírus. Foram analisadas um total de 3927 amostras, onde foram tidas em conta várias características da mãe, como a idade, raça, país de nascimento e nível de educação.

Realizaram-se testes de PCR em todas amostras, onde a extração de DNA viral foi efetuada através do método de extração por choque térmico. As amostras cujo resultado foi positivo para CMV, foram submetidas a testes serológicos para a detecção de IgM. A detecção de IgG foi feita em todas as amostras. <sup>29</sup>

Da totalidade das amostras, apenas vinte e oito confirmaram tratar-se de casos de infecção congénita, em que se observou a presença de IgG em todas elas, mas, somente em sete amostras se verificou a presença de IgM. <sup>29</sup> Contudo, em todos os estudos, é necessário ter alguma precaução na análise dos resultados obtidos, isto porque podem existir falsos-positivos. Se for detetada uma IgM positiva, deve recorrer-se ao teste da Avidéz das IgG, por exemplo, o que permite discriminar entre uma infecção antiga e infecção recente, ou seja, que ocorreu há menos de três meses. <sup>12</sup>

A sensibilidade dos testes de DBS é altamente variável devido à influência dos componentes do sangue e da metodologia de extração de ácidos nucleicos utilizada. Contudo, conclui-se que a infecção congénita por CMV é identificada em 6,1% das crianças suspeitas. <sup>30</sup> É necessário ter em consideração a amostra que é utilizada porque a carga viral pode variar consoante o líquido biológico, como é exemplo o sangue onde esta é menor comparativamente à carga viral encontrada na urina ou saliva. <sup>29</sup>

Verifica-se, porém, uma sensibilidade superior a 95% em testes retrospectivos de diagnóstico de infeções congénitas por CMV. <sup>32</sup>

Em conclusão, a utilidade dos DBS é bastante significativa no diagnóstico e monitorização de infeções por CMV. Para além disso, este tipo de amostras representa um biobanco universal de recém-nascidos o que permite realizar diagnósticos retrospectivos de infeções congénitas pelo vírus em questão. <sup>30</sup>

## **Vírus Herpes Simplex**

Em semelhança ao CMV, o vírus Herpes Simplex (HSV) pertence à família *Herpesviridae*, sendo um dos oitos vírus desta família que afeta o ser humano. Este vírus infeta inicialmente as células epiteliais da mucosa oral ou genital, pele ou córnea. O HSV pode entrar nos neurónios e ser transportado até ao seu núcleo, onde estabelece infeções latentes. Subdivide-se em HSV do tipo 1 (HSV-1), que infeta pelos lábios ou nariz entre os seis a dezoito meses de idade, e em HSV do tipo 2 (HSV-2), agente causador do herpes genital transmitido por via sexual. <sup>28</sup>

O HSV-2 é o principal agente causador de infecções neonatais por HSV, estando relacionada com o surgimento de graves sequelas. O herpes genital na gravidez é bastante comum, mas, a taxa de transmissão à criança é relativamente baixa. Sendo assim, o diagnóstico precoce e tratamento destas infecções é extremamente importante porque reduz a mortalidade e a gravidade das sequelas associadas.<sup>33</sup>

As infecções por herpes genital podem ser provocadas tanto por HSV-2 como por HSV-1. Quando um indivíduo com ausência de anticorpos para HSV-1 ou HSV-2 adquire um dos tipos de vírus no trato genital, ocorre um primeiro episódio de infecção primária. A reativação viral a partir da latência e subsequente translocação anterógrada do vírus de volta para a pele e superfícies mucosas produz um infecção recorrente.<sup>34</sup>

Uma mulher grávida que é alvo de uma infecção primária por HSV apresenta um elevado risco de transmissão ao seu bebê. O vírus pode ser adquirido durante três intervalos de tempo distintos: intrauterino, perinatal e pós-natal. O período perinatal é onde ocorre uma maior taxa de transmissão, cerca de 85%.<sup>34</sup>

A detecção de DNA de HSV pode realizar-se em DBS efetuados com amostras de fluido cefalorraquidiano. Esta abordagem pode ser utilizada em todos os casos em que a infecção por este vírus possa ser considerada como provocadora de sepsis em recém-nascidos, particularmente na ausência de lesões herpéticas na mãe. A monitorização de crianças assintomáticas ao nascimento cujas mães apresentem um historial de infecção por HSV, antes e durante a gravidez, permite a identificação das que estão em risco de desenvolver a doença.

<sup>35</sup>

Como referido, anteriormente, a análise da presença de DNA de HSV em DBS permite prever a ocorrência de uma reinfeção. Para esse efeito, a criança deve encontrar-se num período virémico aquando da recolha dos mesmos, entre o terceiro e quinto dias após o nascimento. O intervalo entre a amostragem e o início da doença é o fator mais importante para um resultado positivo.<sup>33</sup>

A nova geração de testes serológicos de HSV baseia-se na detecção dos anticorpos para a glicoproteína G1 (gG1) e glicoproteína G2 (gG2), que são marcadores para o HSV-1 e HSV-2, respetivamente.<sup>36</sup> A glicoproteína G (gG) é um biomarcador bastante importante em estudos de prevenção por HIV e por outras infecções sexualmente transmissíveis.<sup>37</sup> A possibilidade de utilização de DBS para os testes serológicos baseados na detecção de gG permite a expansão dos estudos de seroprevalência assim como o diagnóstico do herpes genital.<sup>36</sup>

Num estudo realizado por Hogrefe et al. <sup>36</sup>, cujo objetivo era avaliar a reconstituição da imunoglobulina G em DBS e sua utilidade na serologia do HSV, foi comparada a consistência entre os resultados obtidos pela eluição da IgG presente em DBS e a IgG presente em amostras de soro correspondentes. Verificou-se que existia uma ligeira variância entre os resultados obtidos. No entanto, a maioria dos pares de amostras apresentaram resultados consistentes, situando-se o desvio de resultados entre os 10 a 15%.

É de salientar que, no estudo acima referido, era expectável que os anticorpos para HSV-1 e HSV-2 partilhassem das mesmas condições de estabilidade e recuperação do analito a partir de uma matriz sólida. A reatividade das glicoproteínas recombinadas também deveria ser semelhante. Contudo, observa-se que a reatividade da gG2 decresce após um ano de armazenamento, ao contrário do que ocorre com a gG1. <sup>36</sup>

É possível concluir, segundo os dados obtidos por Hogrefe et al. <sup>36</sup>, que as amostras mais vantajosas de utilizar na determinação de uma infeção por HSV são aquelas que são armazenadas por um curto espaço de tempo o que significa que, possivelmente, a deteção destas glicoproteínas não seja um método a adotar na realização de estudos retrospectivos.

No entanto, num estudo realizado por Ilona et al. <sup>33</sup>, conclui-se que a determinação de DNA de HSV através de DBS é uma ferramenta adicional de diagnóstico quando se efetuam estudos retrospectivos do início precoce do herpes, podendo também ser útil no acompanhamento de crianças expostas à doença. Devem ter-se em conta os níveis de sensibilidade obtidos para o estudo, o que significa que este método talvez não seja o mais indicado na monitorização em larga escala das infeções neonatais por HSV.

### **Vírus da Imunodeficiência Humana**

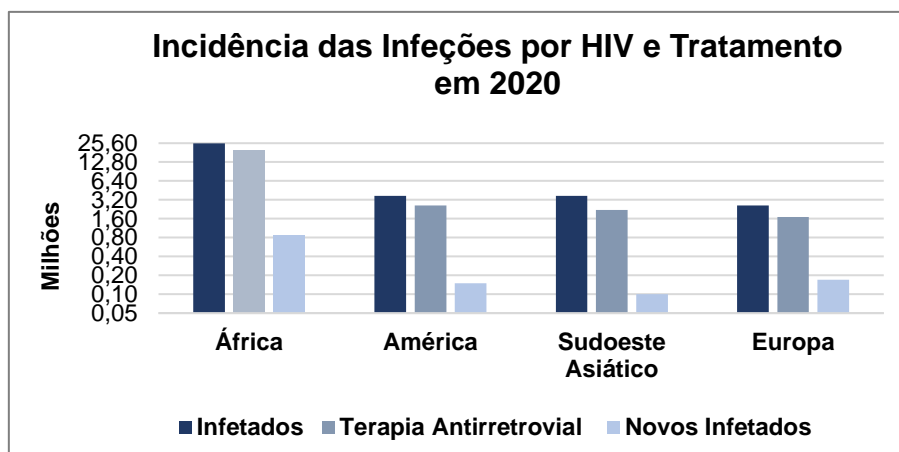
O vírus da imunodeficiência humana (HIV) pertence à família *Retroviridae*, sendo o seu genoma a ssRNA (+). Esta família é composta por diversos vírus que provocam doença em mamíferos, tal como o vírus da leucemia felina e o vírus do sarcoma de Rous. O síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) é a designação do estadi final da doença provocada por este vírus. <sup>28,38</sup>

O vírus HIV do tipo 1 e 2 pertencem ao género *Lentivirus*, devido ao curso lento da doença que provocam. O seu genoma é complexo, contendo os genes *gag*, *pol*, e *env*, mas também genes reguladores não estruturais. A SIDA é provocada por estes dois retrovírus, sendo o HIV-1 é um vírus mais prevalente responsável pela pandemia de SIDA em todo o mundo,

enquanto o HIV-2 se encontra restrito a países da África Ocidental e outros que partilhem relações socioculturais com os mesmos. <sup>28,39</sup>

Este vírus pode ser transmitido através do contato sexual, transmissão vertical, transfusão de sangue ou por troca de agulhas ou outros objetos corto-perfurantes. A eficiência da transmissão é influenciada pela concentração das partículas virais no fluido biológico a que é exposto o indivíduo. <sup>38</sup>

Em 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou a existência de 37.7 milhões de pessoas infectadas com HIV, tendo surgido 1.5 milhões de novas infecções nesse mesmo ano. Apenas 84% dos infectados sabem que têm a doença. Sendo a SIDA o maior problema de saúde pública a nível global, é bastante importante que haja uma deteção precoce e monitorização correta do curso da doença e do seu tratamento. <sup>40</sup>



**Gráfico 1. Incidência das infecções por HIV e tratamento em 2020.** A Organização Mundial de Saúde, em 2020, relatou que existem cerca de 37.7 milhões de infectados por HIV em todo mundo. Dos infectados a nível global, apenas 84% sabe da sua condição de saúde. O tratamento antirretroviral é aplicado a 27.5 milhões de pessoas. Em 2020, 680 000 indivíduos morreram de causas relacionadas com HIV. Os dados apresentados referem-se ao número de infectados em cada continente, onde se verifica uma maior incidência no continente africano. O tratamento antirretroviral é aplicado à maioria dos indivíduos infectados. A nível mundial, no fim de 2020, 1.5 milhões de indivíduos tornaram-se seropositivos para HIV.

(Adaptado de: "Key Facts HIV Global Data", WHO, 2020)

A maioria dos casos de infeção por HIV ocorre em locais remotos onde as condições de saúde e diagnóstico são precárias. Por esse motivo, o diagnóstico e monitorização dos indivíduos infectados carecem de metodologias que sejam baratas e fáceis de executar. Os DBS apresentam um papel signficante na mitigação destes fatores logísticos.

O plasma obtido a partir de sangue total, colhido por venipunctura, é o principal tipo de amostra utilizado no diagnóstico e monitorização da terapia em seropositivos para HIV. Este produto biológico deve ser separado por centrifugação e congelado para armazenamento e transporte para o laboratório. Em países com recursos limitados, a estabilidade da amostra

desde o momento da colheita até à separação do plasma e análise pode alterar-se, afetando a medição da carga viral. Estima-se que a estabilidade do RNA do HIV-1 em DBS seja de um ano ou mais à temperatura ambiente. <sup>41,42</sup>

Diversos estudos demonstraram que ácidos nucleicos, como o DNA e RNA, e anticorpos podem ser estáveis em amostras de DBS por algum tempo, podendo ser utilizados em procedimentos serológicos e de PCR na deteção viral do HIV. Para analisar a capacidade de deteção e sensibilidade dos DBS, os resultados obtidos para estas amostras são comparados aos obtidos em amostras de plasma de referência. <sup>43</sup>

Num estudo realizado em 2021, onde é avaliada a capacidade de deteção simultânea de RNA e DNA de HIV-1 e HCV em kits de deteção chineses, foram utilizadas 571 amostras de sangue pertencentes a utilizadores de drogas injetáveis e a homens com relações homossexuais. Os pares de amostras foram submetidos, inicialmente, a um teste serológico de monitorização da presença de anticorpos anti-HIV por ELISA, tendo sido confirmados todos os resultados positivos. Nas amostras positivas, foi medida a carga viral do HIV-1 por RT-PCR. <sup>43</sup>

Das 571 amostras, 38 revelaram a presença de anticorpos anti-HIV, tendo sido confirmada a positividade em apenas 32. A quantidade reduzida de anticorpos pode levar a resultados falsos negativos quando utilizados os DBS como amostra se se tratar de uma infeção aguda ou recente, onde a resposta de anticorpos está a surgir, ou quando o tratamento é eficiente, havendo um decréscimo da estimulação antigénica e consequente diminuição dos anticorpos anti-HIV. <sup>43,44</sup>

Na deteção de ácidos nucleicos, cinco amostras não detetaram RNA de HIV quando a carga viral é baixa. A baixa sensibilidade de deteção de RNA nos DBS pode estar associada com os níveis baixos verificados no plasma ou com a sua degradação neste tipo de amostra. <sup>43</sup>

O DNA de HIV-1 pode ser utilizado como marcador virológico no diagnóstico da infeção por este vírus por ser um biomarcador dos seus reservatórios, denotando a sua persistência nas células e tecidos infetados que participam na patogénese. Os resultados obtidos para a deteção de DNA foram consistentes com os resultados de RNA, anteriormente referidos. <sup>43</sup>

É possível concluir através deste estudo que os DBS podem ser utilizados para detetar RNA e DNA de HIV-1, assim como material genético de outros vírus a partir de apenas uma amostra. Contudo, é necessário estabelecer um protocolo de referência que permita padronizar diversos aspetos dos DBS como a colheita, eluição e extração de ácidos nucleicos.

## **Vírus das Hepatites B e C**

As hepatites virais crónicas B (HCB) e C (HCC) representam um problema de saúde bastante importante a nível mundial com milhões de indivíduos infetados. Uma infeção persistente por estes vírus conduz ao surgimento de doença hepática e carcinoma hepatocelular. <sup>45</sup>

O vírus da hepatite B (HBV) pertence à família *Hepadnaviridae* cujos genomas são a dsDNA. O HBV encontra-se presente no sangue e sémen dos indivíduos infetados e os modos de transmissão são, geralmente, paralelos àqueles encontrados na transmissão do HIV. Os hepatócitos são as células hospedeiras utilizadas por este vírus. <sup>28</sup>

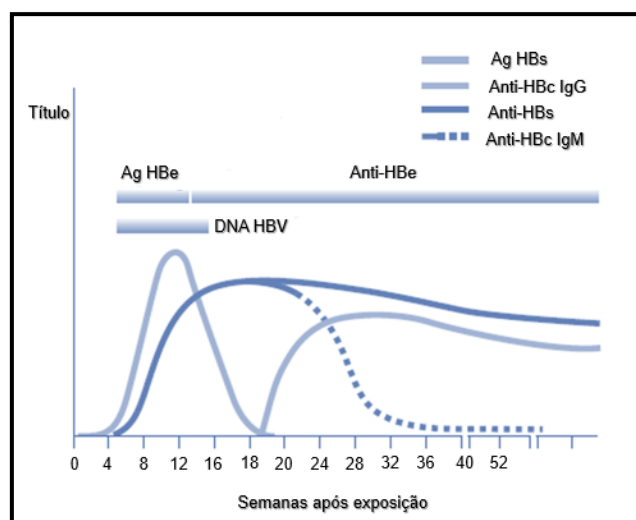
O vírus da hepatite C (HCV), membro da família *Flaviviridae*, apresenta genoma a ssRNA+. O HCV é transmitido, regularmente, por exposição a sangue contaminado, nomeadamente através da partilha de seringas por utilizadores de drogas intravenosas. A transmissão sexual é possível assim como a transmissão nosocomial. Os níveis de partículas virais podem ser bastante elevados no sangue visto que circulam grandes volumes de sangue pelo fígado, o local de maior infeção. <sup>39</sup>

### **Vírus da Hepatite B**

De acordo com a OMS, é estimado que existam 240 milhões de pessoas infetadas cronicamente com HBV, morrendo devido a complicações da doença cerca 780 000 por ano. É recomendada, por esse motivo, a monitorização da infeção por HBV em zonas onde este vírus é endémico. <sup>46</sup>

Os testes serológicos da Hepatite B envolvem a análise de diversos antigénios e anticorpos específicos do HBV. Estes diferentes marcadores serológicos ou combinações de marcadores são utilizados para identificar os diferentes estadios da infeção por HBV e determinar se o doente apresenta uma infeção aguda ou crónica, se é imune ao vírus como resultado de uma infeção anterior ou vacinação, ou se é suscetível. <sup>47</sup>

Para deteção de infeção por HBV podem ser utilizados os antigénios HBs e HBe e respetivos anticorpos, Anti-HBs e Anti-HBe, assim como o anticorpo Anti-HBc. Para confirmar a presença do vírus, analisa-se a presença de DNA de HBV no soro ou plasma do indivíduo de modo a confirmar a infeção. <sup>48</sup>



**Figura 5. Padrão serológico observado, usualmente, na infecção aguda por hepatite B.** Ag HBs= Antígeno de superfície da hepatite B; Anti-HBs= Anticorpo de superfície da hepatite B; Anti-HBc= Anticorpo core da hepatite B; Ag HBe= Antígeno e da hepatite B; Anti-HBe= Anticorpo contra o antigênio e da hepatite B.

(Adaptado de: "Pocket Guide to Diagnostic Tests", 6ª edição, 2012)

A detecção da infecção por este vírus requer condições que não estão disponíveis na maioria dos países onde é endêmica. Por esse motivo, os DBS têm sido cada vez mais utilizados na identificação de casos positivos e na monitorização do tratamento aplicado. No entanto, é importante perceber se os marcadores serológicos da infecção por HBV são detetados em amostras de DBS, sendo esta uma possível alternativa às amostras de soro.

Num estudo realizado no Brasil, onde foi estudada a possibilidade dos DBS substituírem as amostras de soro na detecção de Ag HBs, Anti-HBc e Anti-HBs, foram analisadas amostras de indivíduos divididos em três grupos de acordo com a colheita da amostras e vulnerabilidade na aquisição de HBV.<sup>49</sup>

O grupo 1 era composto por indivíduos com casos de infecção aguda e crônica por HBV ou com suspeita de infecção, apresentando ou não outras infecções como HCV. O segundo grupo continha indivíduos da população em geral que viviam em zonas endêmicas, mas que não tinham a infecção ou sintomas sugestivos da mesma. Por fim, o último grupo era formado por indivíduos vulneráveis pela sua exposição a materiais contaminados a sangue e por consumidores de cocaína.<sup>49</sup>

Neste estudo, a performance dos DBS variou de acordo com o marcador serológico analisado e grupo de estudo. Para além disso, existem também outros fatores que influenciam a presença de marcadores como o Ag HBs no soro e DBS. De entre eles a idade, viver com

uma pessoa com HIV ou hepatite, transfusão de sangue anterior, acupuntura, uso de preservativo na relação sexual, vacinação contra o HBV, entre outros. <sup>49</sup>

A detecção de Ag HBs foi obtida com sucesso no contexto clínico e entre indivíduos reativos para Anti-HBc, sendo a concordância entre DBS e amostra de soro de 76,9% com sensibilidade e especificidade superiores a 80%. No entanto, no segundo grupo correspondente à população em geral, a sensibilidade do teste foi de 37,5% o que pode estar relacionado com a baixa prevalência deste marcador. <sup>49</sup>

Os resultados para o Anti-HBc foram bons em contexto clínico devido ao elevado número de indivíduos com infeção por HBV ativa. Contudo, a detecção de Anti-HBs obteve valores de sensibilidade e especificidade baixos em todos os grupos. <sup>49</sup>

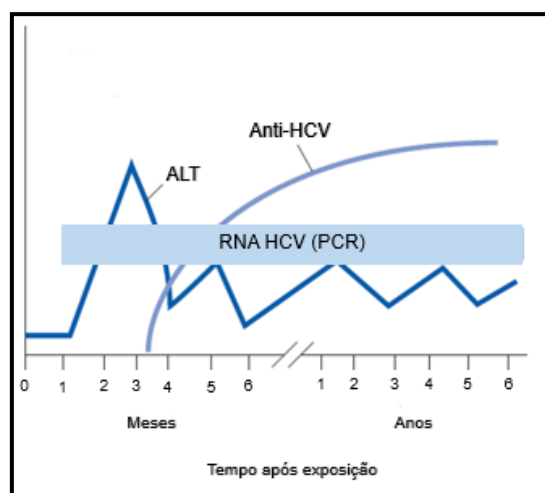
Através dos dados referidos, é possível concluir que os DBS demonstraram baixa sensibilidade em todos os marcadores serológicos da infeção por HBV na população em geral. Isto pode dever-se ao manuseio das amostras de soro e processamento tardio das mesmas. <sup>49</sup>

Mais uma vez, as condições de processamento e armazenamento das amostras de DBS podem afetar os resultados obtidos através da diminuição da estabilidade do analito. O armazenamento à temperatura ambiente durante um longo período reduz a reatividade da amostra entre os 10-20%, existindo pequenas variações na estabilidade se as amostras e respetivos eluídos forem conservados a -20°C ou -70°C. <sup>50</sup>

## **Vírus da Hepatite C**

Globalmente, estima-se que 58 milhões de pessoas tenham infeção crónica por hepatite C, surgindo 1.5 milhões de novas infeções por ano. No ano de 2019, cerca de 290000 pessoas morreram de hepatite C, a maioria de cirrose e de carcinoma hepatocelular. <sup>51</sup>

A testagem para determinação do estado da infeção por HCV envolve o teste de anticorpos para o vírus, Anti-HCV, e a detecção do RNA em amostras de soro ou plasma para um diagnóstico correto. A presença de anticorpos não distingue por si só uma infeção aguda, crónica ou resolvida, sendo por isso a testagem de RNA de HCV tão importante. <sup>52</sup>



**Figura 6.** Decurso de uma infecção crônica por hepatite C. **ALT**= alanina aminotransferase; **Anti-HCV**= anticorpo contra a hepatite C. **RNA HCV (PCR)**= detecção de RNA de HCV por *Polymerase Chain Reaction*.

(Adaptado de: "Pocket Guide to Diagnostic Tests", 6ª edição, 2012)

As populações de maior risco são os toxicodependentes, imigrantes e trabalhadores do sexo. Nestes indivíduos, a colheita de sangue por flebotomia não é um processo fácil, estando indisponível em locais com recursos limitados.<sup>52</sup> Os DBS, aplicados com sucesso no diagnóstico de HIV, são também utilizados no diagnóstico de HCV, o que permite a monitorização das populações de maior risco e identificação do estado da infeção.

Embora os DBS sejam bastante utilizados na monitorização da infeção por HCV, os valores de sensibilidade e especificidade permanecem incertos, não existindo ainda uma metodologia laboratorial estabelecida.<sup>53</sup>

De modo a averiguar a especificidade e sensibilidade dos DBS na deteção do Anti-HCV e do RNA do vírus, Dokubo et al.<sup>52</sup> realizaram um estudo retrospectivo da presença de HCV em jovens adultos e utilizadores de drogas injetáveis em São Francisco. Para isso, foram utilizadas amostras de plasma e de DBS comparando os resultados obtidos em ambas.

Na deteção de Anti-HCV, as amostras de DBS identificaram 70% dos testes positivos como verdadeiros positivos e 30% como falsos negativos. Todas as amostras negativas foram classificadas corretamente, refletindo uma especificidade de 100%.<sup>52</sup>

Na deteção de RNA, os DBS identificaram corretamente 90% dos casos positivos como verdadeiros positivos e 10% como falsos negativos. Em semelhança à deteção de Anti-HCV, os casos negativos foram todos confirmados através desta metodologia.<sup>52</sup>

Os resultados obtidos no artigo referido são comuns a outros cujo objetivo era comum. Vázquez-Morón et al.<sup>53</sup>, elaboraram um artigo de revisão dos diversos estudos realizados até Março de 2018, tendo obtido para a análise de Anti-HCV valores de sensibilidade e especificidade de 96,1% e 99,2%, respetivamente. Quanto à deteção de RNA de HCV, os resultados foram de 97,8% e 99,2%.

Estes valores demonstram que os DBS são um método indicado na deteção e diagnóstico da infeção por HCV, sendo os resultados obtidos semelhantes aos das amostras de soro e plasma. Para além disso, este método demonstrou não sofrer qualquer alteração na deteção da carga viral de HCV na presença de outras infeções virais como o HIV, ao contrário do que pode ocorrer no plasma.<sup>54</sup> Todavia, é necessário ter em atenção as condições de armazenamento e transporte das amostras para que não exista degradação do analito em análise.

### **Vírus do Sarampo e da Rubéola**

Inúmeras doenças virais apresentam manifestações clínicas cutâneas. O exantema cutâneo é o marcador principal em muitos dos casos, sendo uma manifestação clínica ocasional em outras doenças. Quando surge, pode ser auxiliar de diagnóstico do agente infeccioso que está na sua origem.<sup>55</sup>

O vírus do sarampo e da rubéola são parte do conjunto dos exantemas mais comuns da infância, onde se encontram a roséola, a varicela e a quinta doença, provocada pelo parvovírus.<sup>39</sup>

As crianças são, por esse motivo, a maior fonte da infeção pelos vírus referidos devido à exposição nas escolas. Consequentemente, são elas o maior alvo de vacinação, o que contribui para a diminuição da morbidade e mortalidade associadas a estas faixas etárias.<sup>39</sup>

As infeções em questão são, muitas vezes, difíceis de distinguir entre si devido às manifestações clínicas que têm em comum. O diagnóstico laboratorial através da deteção de anticorpos específicos ou material genético é, por isso, bastante importante, nomeadamente, em países onde a cobertura vacinal é ineficaz.

## Vírus do Sarampo

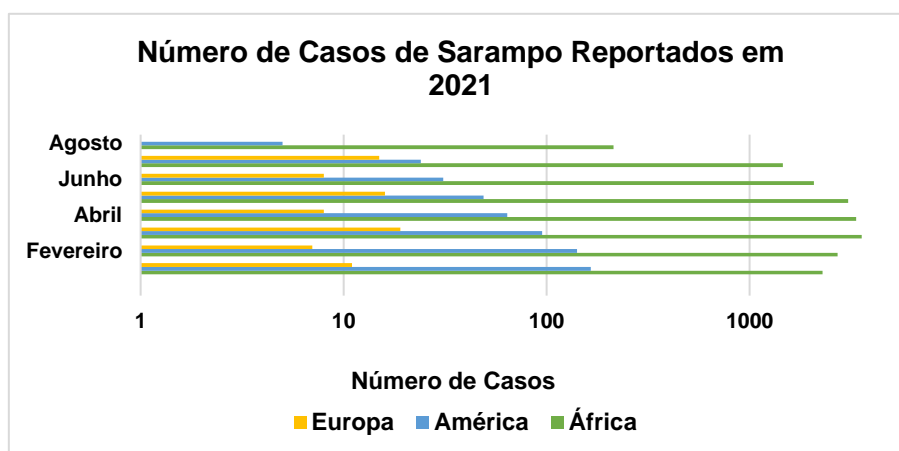
O sarampo é uma doença altamente contagiosa provocada por um vírus da família *Paramyxoviridae*, com genoma a ssRNA<sup>-</sup>. A sua contágiosidade deve-se à via primária de transmissão, a via respiratória. Este vírus é transmitido através de contacto direto e de aerossóis. Após a infeção das células do trato respiratório, o vírus do sarampo tem a capacidade de se disseminar pelo organismo, podendo originar estadios virulentos graves.

39,56,57

Esta doença é prevalente em crianças, sendo contraída nos primeiros anos de escola. Os primeiros sintomas a surgir são febres altas, tosse, conjuntivite e coriza. Neste período o doente é extremamente infeccioso. Algumas infeções podem levar a complicações mais severas como pneumonia, difteria e encefalite.<sup>39</sup>

A vacinação contra o vírus do sarampo é utilizada há cerca de sessenta anos, estando integrada na estratégia mundial de redução da mortalidade e morbilidade por este vírus. No entanto, nos países em vias de desenvolvimento as campanhas de vacinação têm menos sucesso do que o verificado nos países desenvolvidos. Isto pode dever-se à falta de vacinas, guerras civis, problemas logísticos relacionados com a manutenção da cadeia fria, entre outros.<sup>56,58</sup>

O diagnóstico da infeção por sarampo em países em desenvolvimento tem por base a avaliação dos sintomas clínicos. Todavia, nem sempre os sintomas clínicos apresentados se relacionam diretamente com a infeção em questão, levando a diagnósticos incorretos. Por estes motivos, o diagnóstico e confirmação laboratorial apresenta um papel importante no controlo e eliminação do vírus.<sup>58</sup>



**Gráfico 2. Número de casos de sarampo reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de janeiro a agosto de 2021, em África, América e Europa.** Devido à pandemia por SARS-CoV-2, a propagação e diagnóstico de outras infeções respiratórias, como o sarampo, foi afetada devido às medidas preventivas adotadas.

O diagnóstico laboratorial deste vírus assenta, sobretudo, na deteção de IgM específica em amostras de soro e também na deteção do genoma por RT-PCR. Todavia, a deteção da IgG específica e avidéz podem auxiliar na confirmação de uma infeção aguda e na distinção entre infeção recente ou imunização anterior com recurso a vacina. O título de IgM específica permanece detetável durante quatro semanas após o início das erupções cutâneas, podendo não ser detetada até três dias após o começo dos sintomas o que pode originar resultados falsos negativos. O RNA viral pode ser detetado no soro sete dias antes da erupção cutânea, permanecendo detetável durante duas semanas ou mais. <sup>58-60</sup>

O soro é a amostra mais utilizada na serologia do sarampo enquanto os esfregaços de garganta, urina e sangue total são amostras utilizadas na caracterização genética. <sup>58,59</sup>

Os DBS têm sido utilizados como alternativa na deteção de IgM e na realização de RT-PCR em situações em que o soro pode não ser facilmente obtido e armazenado, como em alguns países em desenvolvimento. <sup>61</sup>

A precisão dos DBS na medição dos marcadores serológicos do sarampo é bastante variável, demonstrando uma sensibilidade entre 99 e 100%, e uma especificidade de 75 a 100%. A variabilidade pode resultar da qualidade da amostra colhida, em que o volume pode ser insuficiente impedindo a deteção de anticorpos específicos. Para além disso, como é um tipo de amostra ainda pouco utilizado, os imunoensaios enzimáticos de deteção destes analitos não estão validados. <sup>58,62</sup>

Num estudo de Prosperi et al.<sup>62</sup>, a concordância entre as amostras de soro e DBS foi de 98% para o sarampo. No entanto, verificou-se que a concentração de anticorpos é menor do que no soro. O diagnóstico serológico de sarampo em DBS tem, por essa razão, algumas desvantagens. Das quais a colheita precoce numa fase onde os níveis de IgM se encontram baixos devido ao início da infeção ou falha vacinal; contaminação da amostra aquando da secagem ao ar da gota de sangue no papel de filtro, permitindo o depósito de fungos e bactérias. <sup>58</sup>

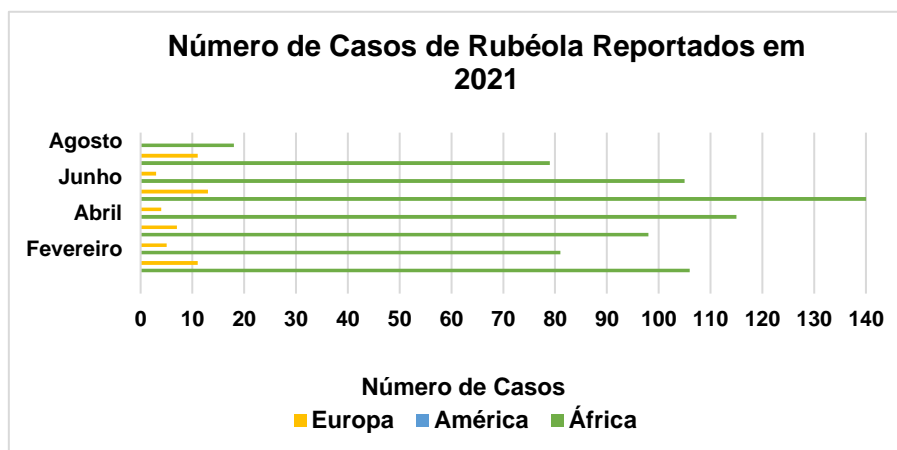
É recomendado que a análise serológica de IgM e IgG específicas do vírus do sarampo seja complementada com a técnica de RT-PCR. Este conjunto de análises permite reduzir o número de resultados falsos negativos. <sup>58</sup>

## Vírus da Rubéola

O vírus da rubéola é membro da família *Matonaviridae* pertencendo ao género *Rubivirus*. Este vírus apresenta genoma ssRNA<sup>+</sup> e é o agente causador da doença da rubéola, também denominada de sarampo alemão. <sup>63</sup>

Embora a maioria dos casos de infeção seja leve e autolimitada como na doença do sarampo, podem surgir complicações quando o vírus da rubéola infeta o feto, particularmente durante o primeiro trimestre, podendo levar a aborto espontâneo ou ao síndrome da rubéola congénita. <sup>63</sup>

O vírus da rubéola é transmitido de pessoa para pessoa por via respiratória, tendo um período de incubação de catorze a vinte e um dias. A imunidade após infeção natural ou vacinação é vitalícia. Na ausência de vacinação, a idade média de infeção é entre os cinco e os nove anos. <sup>55,63</sup>



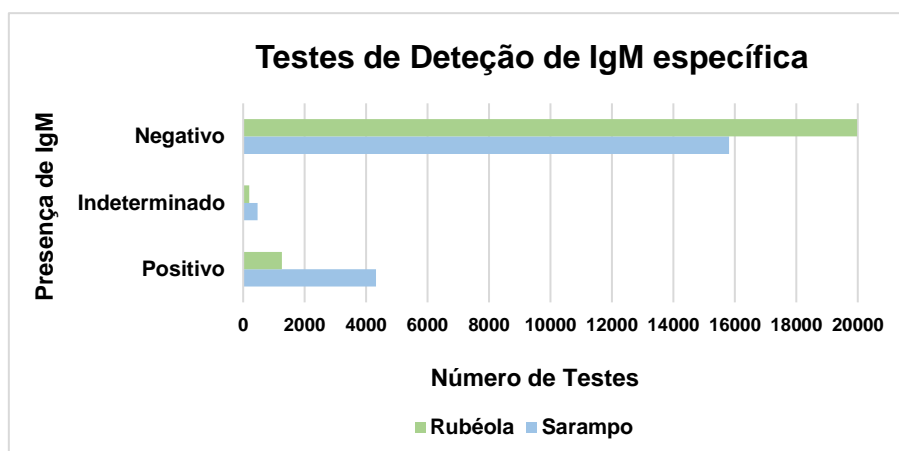
**Gráfico 3. Número de casos de rubéola reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de janeiro a agosto de 2021, em África, América e Europa.** A América não apresenta qualquer caso o que se pode dever a atrasos no reporte dos mesmos.

(Adaptado de: "Global Measles and Rubella Update- September 2021", WHO, 2021)

A deteção de IgM específica da rubéola no soro é o método utilizado no diagnóstico laboratorial desta infeção. Todavia, também podem ser utilizados esfregaços de garganta, saliva, secreções nasofaríngeas e DBS. <sup>60,63</sup>

Os anticorpos IgM específicos podem não ser detetáveis até quatro dias antes do começo das erupções cutâneas e, em casos raros, os doentes podem não produzir anticorpos detetáveis. Estes anticorpos persistem cerca de oito semanas após infeção natural, e cerca de seis meses após vacinação. <sup>60</sup>

Os testes de avididade da IgG específica são úteis na classificação de casos suspeitos, permitindo classificar uma infecção como recente ou antiga. A baixa avididade da IgG anti-rubéola sugere uma infecção recente.<sup>63</sup>



**Gráfico 4. Número de testes laboratoriais de detecção de IgM específica de sarampo e rubéola realizados em 2021, reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).** O número de testes em cada um dos resultados obtidos (positivo, indeterminado e negativo) advém da soma do número de testes realizado nos membros pertencentes à OMS dos continentes africano, americano e europeu.

(Adaptado de: "Global Measles and Rubella Update- September 2021", WHO, 2021)

De modo a provar a fiabilidade dos DBS como amostra na detecção de rubéola, Ivanova et al.<sup>64</sup>, elaboraram um estudo cujo objetivo era determinar a frequência dos anticorpos específicos para este vírus neste tipo de espécime.

Foi utilizado um total de 101 amostras de doentes com idade entre os um e oitenta e dois anos de idade. Todas as amostras foram testadas para a presença de IgM e IgG anti-rubéola, através de um ensaio de ELISA.<sup>64</sup>

Nenhum dos indivíduos analisados apresentava IgM específica para rubéola, o que significa que não existia qualquer infecção recente por este vírus. No soro, setenta e nove amostras positivaram para a IgG anti-rubéola, enquanto nos DBS apenas setenta e três amostras obtiveram esse resultado.<sup>64</sup>

A concordância entre os resultados obtidos nos dois tipos de amostra foi de 90%, o que demonstra a capacidade dos DBS auxiliarem no diagnóstico de infeções agudas ou passadas de rubéola. Para além disso, este tipo de amostra pode ser utilizado em estudos de serovigilância devido à capacidade de detecção de IgG específica.<sup>64,65</sup>

Helfand et al.<sup>65</sup>, provaram que os DBS podem ser analisados em kits comerciais de detecção da rubéola já existentes, o que torna a sua utilização mais aceitável pelos laboratórios de países subdesenvolvidos. No entanto, enumeraram algumas desvantagens, como a falta de conhecimento sobre o tipo de amostra e conseqüente recusa da colheita; necessidade da

utilização de um papel de filtro de alta qualidade para assegurar o funcionamento de alguns testes; o cuidado a ter com possíveis contaminações se o DBS for usado para análise de DNA ou RNA.

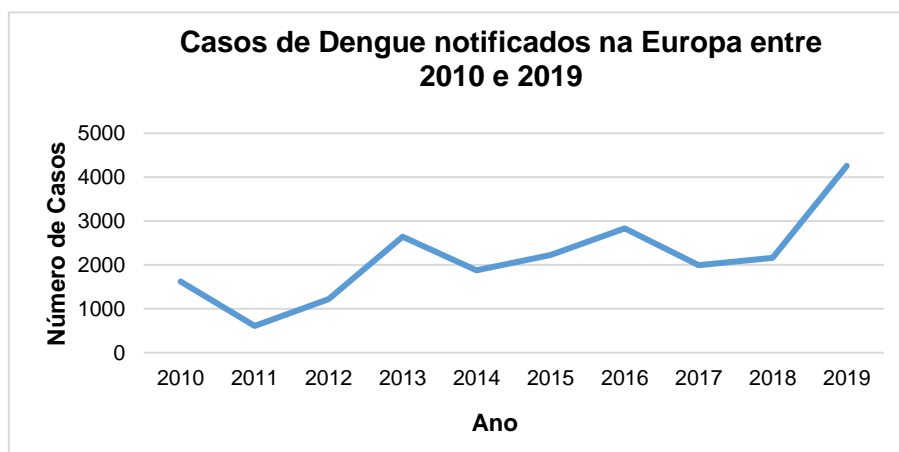
## Vírus do Dengue

O dengue (DENV) é uma infecção viral transmitida por mosquitos, encontrada em climas tropicais e subtropicais. Este vírus pertence à família *Flaviviridae*, apresentando um genoma a ssRNA<sup>+</sup>. É considerado um arbovírus devido ao seu método de transmissão: a picada de um vetor artrópode. <sup>39,66</sup>

O vírus do DENV é transmitido por mosquitos fêmea, maioritariamente, da espécie *Aedes aegypti* e, com menor extensão, por *Aedes albopictus*. Estes mosquitos são também vetores dos vírus Chikungunya, da febre amarela e Zika. <sup>66</sup>

Existem quatro subtipos distintos de dengue, DENV-1 a 4, em circulação nas zonas endémicas, todas elas provocando a forma mais leve da doença. No entanto, se um indivíduo for infetado uma segunda vez por um subtipo diferente do primeiro pode desenvolver a forma mais severa da doença. <sup>39,66</sup>

Atualmente, o DENV é dos arbovírus com maior importância em Saúde Pública a nível mundial. Está presente como vírus endémico em cerca de cem países dos continentes africano, americano e asiático. Contudo, para além do crescente número de casos, a doença começa a surgir em novos locais, incluindo a Europa. <sup>39,66</sup>



**Gráfico 5. Casos de Dengue notificados na Europa entre 2010 e 2019.** A Europa é um dos novos locais onde surgem infecções pelo vírus Dengue. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 2019 foi o ano onde mais casos foram reportados por todo o globo.

(Adaptado de: "Surveillance Atlas of Infectious Diseases")

Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases> ; Acesso em Outubro, 2021

A detecção da infecção por DENV inclui testes virológicos e serológicos. Todavia, a aplicação das diversas metodologias depende do tempo de apresentação do doente. <sup>66</sup>

A amostra pode ser testada por RT-PCR, de modo a detetar o material genético do vírus e caracterizar a estirpe presente, durante os primeiros dias de infecção. Os testes serológicos permitem confirmar a presença de uma infecção recente ou passada, através da detecção de IgM e IgG anti-dengue. Os anticorpos IgM são detetáveis uma semana após a infecção, permanecendo elevados duas a quatro semanas após o começo da doença. Os níveis de IgG demoram mais tempo a surgir, permanecendo no organismo durante anos. <sup>66</sup>

A infecção por DENV pode ser também diagnosticada pela detecção do antígeno NS1 específico, um método mais rápido, mas menos sensível. <sup>67</sup>

Porém, a aplicabilidade e qualidade dos testes serológicos nas regiões endémicas deverá ser avaliada tendo em conta diversos aspetos: potencial reatividade com outros flavivírus; dificuldade em distinguir infecções primárias e secundárias; problemas tecnológicos relacionados com a falta de recursos existente nestas áreas. <sup>68</sup>

Durante os surtos de DENV, o transporte de amostras para laboratórios especializados é relevante de modo a monitorizar a magnitude do surto. O transporte a partir de locais remotos e austeros requer a manutenção da cadeia fria de transporte, o que pode não estar disponível ou ser dispendioso. <sup>69</sup> Os DBS são uma possível solução para todas estas questões.

Num estudo de Balmaseda et al <sup>70</sup>, foi avaliada a utilidade dos diferentes marcadores imunológicos no diagnóstico de doença aguda e medição da incidência da infecção por DENV. Foram comparadas, por um lado, amostras de crianças com suspeita de infecção aguda nos primeiros quatro dias após o início dos sintomas, e por outro, amostras de crianças saudáveis. Os marcadores medidos foram os anticorpos IgM, IgA e IgG anti-dengue presentes em amostras de soro, DBS e saliva.

As amostras de DBS e soro obtiveram valores elevados de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VPP) para a medição de IgM e IgA. Quando é realizada uma medição conjunta da IgM com outro marcador imunológico, os valores de sensibilidade aumentam bastante, mas a especificidade decresce para valores inaceitáveis. <sup>70</sup>

Foi provada a fiabilidade da IgA no diagnóstico do vírus DENV, sendo mais eficaz em infecções secundárias onde apresenta uma sensibilidade de 98%, contrastando com os 90% das infecções primárias. Para além disso, este anticorpo em conjunto com a medição de IgG possibilita resultados satisfatórios na detecção da incidência da doença. <sup>70</sup>

Os DBS podem ser utilizados como amostra para a realização de RT-PCR na detecção de RNA de DENV. Contudo, vários estudos evidenciam que ocorre uma perda substancial de sensibilidade, refletindo um nível baixo de amplificação de RNA a partir do volume reduzido de amostra presente.<sup>69,71</sup>

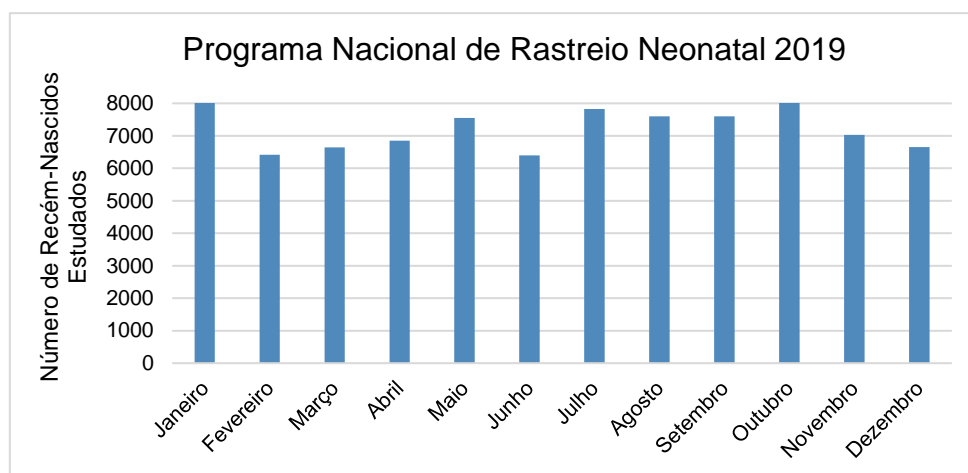
Nos diversos estudos realizados são utilizadas, frequentemente, amostras de soro ou de sangue total para obter DBS. No entanto, esta prática não permite evidenciar a capacidade de detecção do sangue capilar, estando na origem das perdas de sensibilidade acima referidas.<sup>69,71</sup>

Em suma, os *dried blood spots* são um método promissor na detecção da infecção viral por DENV. Para além da capacidade de detecção de marcadores serológicos específicos e RNA viral, permite a conservação dos diversos analitos à temperatura ambiente durante vários dias sem que ocorra degradação dos mesmos. Todas estas vantagens possibilitam a sua aplicação nas zonas endémicas deste vírus onde os recursos de conservação e transporte são escassos.

## Considerações Éticas na Utilização dos *Dried Blood Spots*

A monitorização de recém-nascidos é um dos programas de saúde pública mais bem-sucedidos com benefícios clínicos que incluem informação para planeamento familiar, o diagnóstico e tratamento precoce de crianças identificadas prevenindo a morbilidade e mortalidade infantil.<sup>72</sup>

Em Portugal, o Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) foi criado em 1979 para o rastreio da fenilcetonúria, e em 1981, foi alargado ao diagnóstico do hipotiroidismo congénito. Atualmente, é rastreado um conjunto de vinte e seis patologias.<sup>73</sup>



**Gráfico 6. Resultados do Programa Nacional de Rastreio Neonatal em 2019.** Foram estudados 87 364 recém-nascidos em Portugal. O número de crianças rastreadas no segundo semestre do ano foi superior ao do semestre anterior.

(Adaptado de: “Programa Nacional de Rastreio Neonatal- Relatório 2019”, INSA, 2020)

Após a análise das doenças abrangidas pelos programas de rastreio neonatal, os DBS residuais podem ser armazenados e utilizados com outros propósitos. A utilização destas amostras remanescentes pode incluir o desenvolvimento de novos programas de monitorização e avaliação, investigação biomédica e estudos epidemiológicos de saúde pública. Em 1990, estas amostras foram aplicadas na vigilância da infeção por HIV em diversos países desenvolvidos, sendo uma ferramenta útil na identificação de crianças expostas ao vírus.<sup>72</sup>

Para além disso, os DBS podem fornecer dados relevantes sobre a prevalência de variantes genéticas que podem afetar a saúde pública, relação entre estas e a doença, assim como os fatores de risco associados.<sup>74</sup>

Nos anos mais recentes, o armazenamento e aplicação das amostras resultantes do rastreio neonatal têm ganho especial atenção. Isto deve-se ao surgimento de casos de exploração destas amostras biológicas sem consentimento dos dadores ou responsáveis pelos mesmos.

Nos Países Baixos, em 2000, os DBS foram sugeridos como meio de identificação de vítimas de uma explosão de fogo de artifício. A instituição responsável pelo armazenamento das amostras foi chamada a responder em público devido à falta de conhecimento desta prática pelos pais das crianças a quem pertenciam.<sup>75</sup>

Todos os processos judiciais sobre este tema originam uma crise de confiança nos programas de rastreio e, por consequência, diminuição das amostras de DBS obtidas. Existe, por esse motivo, uma perda da representatividade da população.<sup>76,77</sup>

Os DBS podem ser usados para investigação desde que a mesma preserve a confidencialidade e proteja o dador dos riscos associados. Neste sentido, devem ser aplicados diversos princípios éticos dos quais o respeito pelas pessoas, beneficência e justiça.<sup>78</sup>

A beneficência requer que as pessoas cujo sangue é utilizado não sejam alarmadas, e que os possíveis benefícios sejam maximizados e os possíveis danos minimizados. Para aplicar este princípio, toda a informação sobre o dador deverá ser removida e guardada numa base de dados restrita.<sup>78</sup>

O princípio da justiça requer que seja aplicada equidade a quem recebe os benefícios da investigação e arca com as suas responsabilidades. Qualquer investigação que possa depreciar determinadas populações não deverá ser permitida. Qualquer benefício que advenha do trabalho de investigação deverá estender-se às populações cujas amostras são colhidas.<sup>78</sup>

O respeito pelas pessoas exige que os indivíduos sejam tratados como agentes autónomos. A autonomia refere-se à liberdade de fazer uma escolha informada voluntária baseada no valor próprio. Na prática clínica, o consentimento informado envolve o fornecimento de informação específica acerca da natureza do estudo, assim como os riscos e benefícios envolvidos. É dada aos pais ou tutores a oportunidade de expressar a sua aprovação ou desaprovação acerca do armazenamento dos DBS dos seus filhos.<sup>72,78</sup>

É importante realçar que os DBS contêm informação genética que pode identificar o dador. O armazenamento e utilização secundária destas amostras pode levar a problemas de privacidade e confidencialidade quando o fenótipo ou informação pessoal não é desvinculada. Por conseguinte, os pais podem proteger a privacidade dos filhos através do consentimento informado.<sup>72</sup>

No entanto, a falta de identificação por levar à falta de benefícios por parte do estudo visto que os resultados não podem retornar aos pais ou médicos. Ao nível populacional, a anonimidade limita a utilidade dos estudos visto que os DBS não podem ser colocados em

biobancos. A análise do DNA presente só pode ser interpretada tendo em conta o histórico pessoal.<sup>72</sup>

Em estudo realizado por Gong et al.<sup>79</sup>, cujo objetivo era descrever a perspetiva parental sobre o armazenamento dos DBS colhidos durante os programas de rastreio neonatal e a sua utilização em investigação, obteve conclusões interessantes.

Quanto ao armazenamento das amostras dos filhos por algum tempo, 68% dos inquiridos afirmaram permitir o mesmo. A probabilidade de proibição do mesmo era maior se os pais fossem menos instruídos e por parte das progenitoras. Dos que discordaram com o armazenamento, a solução seria destruir as amostras após o programa de rastreio.<sup>79</sup>

Se a permissão parental fosse requerida inicialmente, a maioria dos pais referiu concordar com a utilização das amostras dos filhos para estudos futuros. Todavia, alguns dos inquiridos referiram concordar com a mesma se a permissão não fosse obtida.<sup>79</sup>

Neste estudo, os inquiridos referiram que os seus filhos deveriam beneficiar dos resultados da investigação no futuro e que os próprios pais deveriam ser parte integrante dos estudos a realizar. Este envolvimento suprime os sentimentos de ansiedade e dúvida associados à utilização das amostras, melhorando a qualidade científica e utilidade do conhecimento médico.<sup>76,79</sup>

Em suma, a transparência e a informação devem ser os princípios máximos quando se pretende armazenar e utilizar os DBS residuais em investigações. O aumento do conhecimento por parte dos interessados está associado ao aumento da confiança nos programas de rastreio neonatal assim como em futuros estudos. Deve, por isso, existir um esforço na promoção da educação sobre o que acontece às amostras remanescentes. A prioridade é maximizar os benefícios que este tipo de material biológico apresenta tanto a nível individual como populacional, e não apenas obter a assinatura do consentimento informado.<sup>80</sup>

## Conclusão

Os *Dried Blood Spots* apresentam um número infindável de vantagens, sendo um recurso bastante relevante em algumas situações onde a recolha de amostras de sangue e posterior análise não é acessível.

Para além de facilitar a colheita de sangue em indivíduos cuja punção venosa é um processo complexo, permite a conservação de diversos analitos à temperatura ambiente. Este tipo de espécime também pode ser concebido com recurso a amostras de urina e saliva, o que favorece a colheita pelo próprio indivíduo.

Ainda assim, é importante realçar que os protocolos laboratoriais estabelecidos para análise dos diversos marcadores biológicos não estão ainda adaptados aos DBS. Isto significa que aquando da sua utilização, podem surgir questões relacionadas com a fiabilidade, exatidão e precisão dos resultados obtidos. Adicionalmente, o sangue capilar, obtido por punção do dedo ou calcanhar, pode não apresentar os analitos em proporção idêntica à do sangue total.

Existem diversas fontes de variabilidade que podem afetar a análise a partir de DBS dos quais o tipo de cartão de filtro, o hematócrito, as condições de armazenamento e as diferenças interindividuais. Para que a utilização deste tipo de amostra seja correta, deve ser minimizada a influência de todos estes fatores através da validação analítica do método com base nas boas normas laboratoriais.

Os DBS são utilizados no rastreio neonatal de distúrbios metabólicos. Mas podem também ser utilizados nos diagnóstico de diversas infeções virais, onde são identificados anticorpos específicos e ácidos nucleicos que permitem evidenciar a sua presença. Este método de amostragem minimiza os riscos associados à manipulação de amostras potencialmente infecciosas.

É nos locais mais remotos que existe uma maior necessidade de diagnóstico e monitorização de variadas infeções virais endémicas. Todavia, nem sempre estão disponíveis os recursos necessários à colheita, transporte e armazenamento das mesmas. Diversos estudos indicam os DBS como uma solução viável para todas essas questões, apresentando valores elevados de sensibilidade e especificidade. Este tipo de amostra é também apontado como vantajoso na realização de estudos retrospectivos.

No entanto, os artigos analisados recorrem, na sua maioria, a amostras de soro para preparar os DBS. Este facto impede que sejam conhecidas as verdadeiras condições de análise quando analisado sangue capilar em vez de soro. É necessário, por esse motivo, desenvolver investigações que comprovem a real fiabilidade dos resultados alcançados por este método analítico.

Têm surgido alguns debates sobre as possíveis utilizações dos DBS após o rastreio neonatal de distúrbios metabólicos. Estas amostras são aplicadas, em alguns casos, em investigações sem o consentimento dos dadores ou responsáveis pelos mesmos. Para esse propósito, devem ser tidas em conta algumas considerações éticas como o respeito pelo dador, preservação da sua confidencialidade e equidade na atribuição dos benefícios resultantes. Deverá ser mantida a transparência e dada toda a informação possível sobre o procedimento para que continue a existir confiança nos rastreios neonatais e em eventuais pesquisas.

## Bibliografia

1. McMorran D, Chung DCK, Toth M, Liew OW, Muradoglu M, Ng TW. Stabilized dried blood spot collection. *Anal Biochem.* 2016;506:28-30. doi:10.1016/j.ab.2016.04.015
2. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. Review article: An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):195-210. doi:10.4269/ajtmh.13-0463
3. Su X, Carlson BF, Wang X, et al. Dried blood spots: An evaluation of utility in the field. *J Infect Public Health.* 2018;11(3):373-376. doi:10.1016/j.jiph.2017.09.014
4. Lim MD. Review article: Dried blood spots for global health diagnostics and surveillance: Opportunities and challenges. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(2):256-265. doi:10.4269/ajtmh.17-0889
5. Li W, Lee MS. *Dried Blood Spots - Applications and Techniques.* Wiley; 2014.
6. Resano M, Belarra MA, García-Ruiz E, Aramendía M, Rello L. Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2018;99:75-87. doi:10.1016/j.trac.2017.12.004
7. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography.* 2007;44(4):899-925. doi:10.1353/dem.2007.0038
8. Bellagambi FG, Lomonaco T, Salvo P, et al. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2020;124. doi:10.1016/j.trac.2019.115781
9. Ostler MW, Porter JH, Buxton OM. Dried blood spot collection of health biomarkers to maximize participation in population studies. *J Vis Exp.* 2014;(83):1-9. doi:10.3791/50973
10. Scientific Fisher T. Basic Principles of RT-qPCR. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>. Published 2020. Accessed April 15, 2020.
11. Arosa F, Cardoso E, Pacheco F. *Fundamentos de Imunologia.* 2ª. Lisboa: LIDEL; 2012.
12. Pereira JM. *Diagnóstico de Infecções Pelo Citomegalovírus (CMV).*; 2019.
13. Enderle Y, Foerster K, Burhenne J. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;130:231-243. doi:10.1016/j.jpba.2016.06.026
14. Grüner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots - Preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *J Vis Exp.* 2015;2015(97):1-9. doi:10.3791/52619
15. Lenicek Krleza J, Dorotic A, Grzunov A, Maradin M. Capillary blood sampling: National recommendations on behalf of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine. *Biochem Medica.* 2015;25(3):335-358. doi:10.11613/BM.2015.034
16. Organization (WHO) WH. *WHO Manual for HIV Drug Resistance Testing Using Dried Blood Spot Specimens.*; 2012. [https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried\\_blood\\_spots/en/](https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried_blood_spots/en/).
17. Wu X, Crask M, Ramirez H, et al. A simple method to elute cell-free HIV from dried blood spots improves their usefulness for monitoring therapy. *J Clin Virol.* 2015;65:38-40. doi:10.1016/j.jcv.2015.01.022
18. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnostics and Management by Laboratory Methods.* 22nd ed. Elsevier; 2011. doi:10.1016/b978-1-4377-0974-2.00017-8
19. O'Mara M, Olson K, Yueh Y, Dunn J, Spooner N, Hudson-Curtis B. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis.* 2011;3(20):2335-2347.

20. Alsous MM, Hawwa AF, McElroy JC. Hematocrit, blood volume, and surface area of dried blood spots – a quantitative model. *Drug Test Anal.* 2020;12(4):555-560. doi:10.1002/dta.2776
21. Hall EM, Flores SR, De Jesús VR. Influence of hematocrit and total-spot volume on performance characteristics of dried blood spots for newborn screening. *Int J Neonatal Screen.* 2015;1(2):69-78. doi:10.3390/ijns1020069
22. De Kesel PMM, Sadones N, Capiou S, Lambert WE, Stove CP. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: Challenges and solutions. *Bioanalysis.* 2013;5(16):2023-2041. doi:10.4155/bio.13.156
23. Adam BW, Hall EM, Sternberg M, et al. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin Biochem.* 2011;44(17-18):1445-1450. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.09.010
24. FDA F and DA. *Bioanalytical Method Validation Guidance.* Vol 1043.; 2018. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
25. Smith G. *European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation: What More Is There to Say?* Vol 4.; 2012. doi:10.4155/bio.12.44
26. Timmerman P, White S, Globig S, Lütke S, Brunet L, Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis.* 2011;3(14):1567-1575. doi:10.4155/bio.11.132
27. Parker SP, Cubitt WD. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol.* 1999;52(9):633-639. doi:10.1136/jcp.52.9.633
28. Carter J, Saunders V. *Virology: Principles and Applications.* Wiley; 2007.
29. Kharrazi M, Hyde T, Young S, Amin MM, Cannon MJ, Dollard SC. Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2010;157(2):191-197. doi:10.1016/j.jpeds.2010.03.002
30. Pellegrinelli L, Galli C, Primache V, et al. Diagnosis of congenital CMV infection via DBS samples testing and neonatal hearing screening: An observational study in Italy. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):5-9. doi:10.1186/s12879-019-4296-5
31. Barbi M, Binda S, Primache V, Luraschi C, Corbetta C. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in dried blood spots. *Clin Diagn Virol.* 1996;6(1):27-32. doi:10.1016/0928-0197(96)00228-0
32. Koontz D, Baecher K, Amin M, Nikolova S, Gallagher M, Dollard S. Evaluation of DNA extraction methods for the detection of Cytomegalovirus in dried blood spots. *J Clin Virol.* 2015;66:95-99. doi:10.1016/j.jcv.2015.03.015
33. Ilona LF, Pia Ö, Marianne F, Gunilla M. Detection of herpes simplex virus DNA in dried blood spots making a retrospective diagnosis possible. *J Clin Virol.* 2003;26(1):39-48. doi:10.1016/S1386-6532(02)00019-7
34. Kimberlin DW. Neonatal Herpes Simplex Infection - Clinical Review. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):1-13. doi:10.1128/CMR.17.1.1
35. Barbi M, Binda S, Primache V, Tettamanti A, Negri C, Brambilla C. Use of Guthrie cards for the early diagnosis of neonatal herpes simplex virus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17(3):251-252. doi:10.1097/00006454-199803000-00017
36. Hogrefe WR, Ernst C, Su X. Efficiency of reconstitution of immunoglobulin G from blood specimens dried on filter paper and utility in herpes simplex virus type-specific serology screening. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(6):1338-1342. doi:10.1128/CDLI.9.6.1338-1342.2002
37. Hobbs MM, Mwanjumba SW, Luseno WK, et al. Evaluation of HSV-2 serological tests for use with dried blood spots in Kenya. 2018;44(2):14-19. doi:10.1097/OLQ.0000000000000557.Evaluation

38. Flint J, Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM. *Principles of Virology*. 4<sup>a</sup>. ASM PRESS; 2015. doi:10.1128/9781555819521
39. Norkin LC. *Virology- Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology Press; 2010. doi:10.5860/choice.47-5632
40. WHO. *Key Facts HIV Global Data.*; 2020. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/key-facts-hiv-2020.pdf?sfvrsn=582c3f6e\\_13](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/key-facts-hiv-2020.pdf?sfvrsn=582c3f6e_13).
41. Hallack R, Doherty LE, Wethers JA, Parker MM. Evaluation of dried blood spot specimens for HIV-1 drug-resistance testing using the Trugene® HIV-1 genotyping assay. *J Clin Virol*. 2008;41(4):283-287. doi:10.1016/j.jcv.2007.12.011
42. van Deursen P, Oosterlaken T, Andre P, et al. Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0. *J Clin Virol*. 2010;47(2):120-125. doi:10.1016/j.jcv.2009.11.021
43. MA JQ, XU QQ, HE L, et al. Exploration of an Efficient Simultaneous Molecular Detection Method of HIV, HCV, and Syphilis from a Single Dried Blood Spot. *Biomed Environ Sci*. 2021;34(4):257-264. doi:10.3967/bes2021.034
44. Stefic K, Guinard J, Peytavin G, et al. Screening for human immunodeficiency virus infection by use of a fourth-generation antigen/antibody assay and dried blood spots: In-depth analysis of sensitivity and performance assessment in a cross-sectional study. *J Clin Microbiol*. 2020;58(1). doi:10.1128/JCM.01645-19
45. Mössner BK, Staugaard B, Jensen J, Lillevang ST, Christensen PB, Holm DK. Dried blood spots, valid screening for viral hepatitis and human immunodeficiency virus in real-life Prospective Study. *World J Gastroenterol*. 2016;22(33):7604-7612. doi:10.3748/wjg.v22.i33.7604
46. Chauffour J, Gummadi N, Nagarathnam A, Roberts T, Cohn J. *PICO 7 - Dried Blood Spots Dried Blood Spots as a Sample Collection Method for Hepatitis B Surface Antigen Serological Testing.*; 2015.
47. Organization (WHO) WH. *Interpretation of Hepatitis B Serologic Test Results*. Vol 54.; 2005. <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/PDFs/SerologicChartv8.pdf>.
48. McPhee DNCMLMPSJ. *Pocket Guide to Diagnostic Tests*. 6<sup>a</sup>. Lange; 2012.
49. Medina H, Salet V, Paula D, et al. Evaluation of accuracy of hepatitis B virus antigen and antibody detection and relationship between epidemiological factors using dried blood spot. *J Virol Methods*. 2020;277(May 2019):113798. doi:10.1016/j.jviromet.2019.113798
50. McAllister G, Shepherd S, Templeton K, Aitken C, Gunson R. Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates. *J Clin Virol*. 2015;71:10-17. doi:10.1016/j.jcv.2015.07.303
51. Organization (WHO) WH. Hepatitis C. Hepatitis C. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Published 2021. Accessed September 18, 2021.
52. Dokubo EK, Evans J, Winkelman V, et al. Comparison of Hepatitis C Virus RNA and antibody detection in dried blood spots and plasma specimens. *J Clin Virol*. 2014;59(4):223-227. doi:10.1016/j.jcv.2014.01.014
53. Vázquez-Morón S, Ardizzone Jiménez B, Jiménez-Sousa MA, Bellón JM, Ryan P, Resino S. Evaluation of the diagnostic accuracy of laboratory-based screening for hepatitis C in dried blood spot samples: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-41139-8
54. Tran TH, Nguyen BT, Nguyen TA, et al. Dried blood spots perform well to identify patients with active HCV infection in Vietnam. *J Viral Hepat*. 2020;27(5):514-519. doi:10.1111/jvh.13263
55. da Silva Carneiro SC, Cestari T, Allen SH, Ramos e-Silva M. Viral exanthems in the tropics. *Clin Dermatol*. 2007;25(2):212-220. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.05.009

56. Organization (WHO) WH. Measles. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles>. Published 2019. Accessed October 2, 2021.
57. Cattaneo R, McChesney M. Measles Virus. In: *Encyclopedia of Virology*. ; 2008:285-291. doi:10.1016/B978-012374410-4.00443-X
58. De Swart RL, Nur Y, Abdallah A, et al. Combination of reverse transcriptase PCR analysis and immunoglobulin M detection on filter paper blood samples allows diagnostic and epidemiological studies of measles. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):270-273. doi:10.1128/JCM.39.1.270-273.2001
59. Mercader S, Featherstone D, Bellini WJ. Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology. *J Virol Methods*. 2006;137(1):140-149. doi:10.1016/j.jviromet.2006.06.018
60. Hübschen JM, Bork SM, Muller CP, et al. Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(8):511-515. doi:10.1016/j.cmi.2017.04.009
61. Mosquera MDM, Echevarría JE, Puente S, Lahulla F, De Ory F. Use of whole blood dried on filter paper for detection and genotyping of measles virus. *J Virol Methods*. 2004;117(1):97-99. doi:10.1016/j.jviromet.2003.12.004
62. Prospero C, Kaduskar O, Bhatt V, et al. Diagnostic Accuracy of Dried Blood Spots Collected on HemaSpot HF Devices Compared to Venous Blood Specimens To Estimate Measles and Rubella Seroprevalence. *mSphere*. 2021;6(4):1-10. doi:10.1128/msphere.01330-20
63. Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. *Lancet*. 2015;385(9984):2297-2307. doi:10.1016/S0140-6736(14)60539-0
64. Ivanova SK, Diseases P, Golkocheva-markova E, et al. Detection of Measles and Rubella Antibodies in Dried Blood Spots. 2019;46(March):20-24.
65. Helfand RF, Keyserling HL, Williams I, et al. Comparative detection of measles and rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and serum samples. *J Med Virol*. 2001;65(4):751-757. doi:10.1002/jmv.2100
66. Organization (WHO) WH. Dengue and severe dengue. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Published 2021. Accessed October 7, 2021.
67. Chakravarti A, Siddiqui O, Malik S, Uppal B. Use of dried blood blotted on filter paper to detect dengue IgM antibody and dengue NS1 antigen. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2013;44(2):226.
68. Tran TNT, de Vries PJ, Hoang LP, et al. Enzyme-linked immunoassay for dengue virus IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood. *BMC Infect Dis*. 2006;6:1-8. doi:10.1186/1471-2334-6-13
69. Maldonado-Rodríguez A, Rojas-Montes O, Vazquez-Rosales G, et al. Serum Dried Samples to Detect Dengue Antibodies: A Field Study. *Biomed Res Int*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/7215259
70. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, et al. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *J Clin Virol*. 2008;43(3):287-291. doi:10.1016/j.jcv.2008.07.016
71. Curren EJ, Tufa AJ, Hancock WT, et al. Reverse transcription-polymerase chain reaction testing on filter paper-dried serum for laboratory-based dengue surveillance-American Samoa, 2018. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;102(3):622-624. doi:10.4269/ajtmh.19-0800
72. Ngan OMY, Li CK. Ethical issues of dried blood spot storage and its secondary use after newborn screening programme in Hong Kong. *Hong Kong J Paediatr*. 2020;25(1):8-15.
73. Jorge IN de SDR. *Programa Nacional de Rastreio Neonatal: Relatório 2019*. Lisboa; 2020. <http://www.insa.min-saude.pt/programa-nacional-de-rastreio-neonatal—relatorio-2019/>.

74. Elster N. *FUTURE USES OF RESIDUAL NEWBORN BLOOD SPOTS : LEGAL AND ETHICAL CONSIDERATIONS*. Vol 45.; 2016. <http://www.jstor.org/stable/29762890>.
75. Van Teeffelen SR, Douglas CMW, Van El CG, et al. Mothers' Views on Longer Storage of Neonatal Dried Blood Spots for Specific Secondary Uses. *Public Health Genomics*. 2016;19(1):25-33. doi:10.1159/000441516
76. Douglas C, Van El C, Radstake M, Van Teeffelen S, Cornel MC. The politics of representation in the governance of emergent "secondary use" biobanks: The case of dried blood spot cards in the Netherlands. *Stud Ethics Law Technol*. 2012;6(1). doi:10.1515/1941-6008.1178
77. Rothwell E, Johnson E, Riches N, Botkin JR. Secondary research uses of residual newborn screening dried bloodspots: a scoping review. *Genet Med*. 2019;21(7):1469-1475. doi:10.1038/s41436-018-0387-8
78. Chrysler D, McGee H, Bach J, Goldman E, Jacobson PD. The Michigan BioTrust for Health: Using Dried Bloodspots for Research to Benefit the Community While Respecting the Individual. *J Law, Med Ethics*. 2011;39(SUPPL. 1):98-101. doi:10.1111/j.1748-720X.2011.00577.x
79. Gong LM, Tu WJ, He J, Shi XD, Wang XY, Li Y. The Use of Newborn Screening Dried Blood Spots for Research: The Parental Perspective. *J Bioeth Inq*. 2012;9(2):189-193. doi:10.1007/s11673-012-9368-9
80. Rothwell E, Wong B, Anderson RA, Botkin JR. The influence of education on public trust and consent preferences with residual newborn screening dried blood spots. *J Empir Res Hum Res Ethics*. 2016;11(3):231-236. doi:10.1177/1556264616656976