

**Avaliação do “*Low Haemoglobin Density*” e  
“*Microcytic Anemia Factor*” como  
parâmetros precoces de ferropénia  
Versão final após defesa**

**Ana Luísa Couto Zagalo de Castro**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Dra. Andreia Sofia dos Reis Monteiro  
Co-orientadoras: Dra. Patrícia Amantegui Ibarzabal e  
Prof. Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa

**outubro de 2021**



# **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, por serem essenciais na minha vida, e por tornarem este momento possível.



# Agradecimentos

À Dr.<sup>a</sup> Andreia, a minha orientadora, um agradecimento muito especial por todas lições, pela paciência e pelo tempo dedicado a este projeto e à minha aprendizagem. Aprendi muito consigo, obrigada.

Às minhas coorientadoras, Dr.<sup>a</sup> Patrícia e Prof. Dr.<sup>a</sup> Ângela, pelo apoio e pela disponibilidade, principalmente num ano tão atípico.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira, em especial à Dr.<sup>a</sup> Conceição Faria, por ter autorizado este estágio e desta forma por me ter proporcionado esta experiência incrível.

À minha amiga e colega, Carolina, pelo apoio, disponibilidade e principalmente por todos os risos que me proporcionou mesmo não estando nos meus melhores dias. Foste muito especial nesta fase tão importantes das nossas vidas. Obrigada por teres partilhado comigo esta experiência.

Agradeço à minha mãe e ao meu pai, por todo o tempo que dedicaram à minha educação e por me tornarem na pessoa que sou hoje. Obrigada pela paciência, pela motivação, obrigada por me ouvirem sempre, mesmo que fosse para reclamar. Obrigada pelo amor. Sem vocês nada seria possível.

À minha irmã Marta, és a que estive comigo, desde sempre, e para sempre.

À Alexandra, à Laura e à Miriam, por serem o meu suporte durante todos estes anos, por nunca me faltarem, por tantas vezes serem meus problemas à frente dos vossos. Vocês são uns anjos na terra. Irei sempre levar-vos comigo para a vida.

À Ana Maia, pelo tempo dedicado a ajudar-me, pelas boas recordações que me deu nesta última etapa da minha vida. Vieste tarde, mas ocupas um lugar gigante neste meu coração.

À Mota e à Chica, por terem sido as pessoas que mais me aturaram nos anos de mestrado, obrigada por todo o apoio e por todas as risadas na biblioteca. Já tenho saudades desses tempos. Adoro-vos.

Aos meus amigos de Lamego, por todos os momentos e por toda a preocupação.



## Resumo

A anemia ferropénica afeta milhares de pessoas globalmente sendo as mulheres as mais afetadas. Esta anemia caracteriza-se pela deficiência de ferro no organismo que pode ocorrer por vários motivos, pela diminuição do consumo de ferro na dieta, aumento do consumo deste pelo metabolismo, elevada perda sanguínea ou ainda em casos de inflamação crónica. O diagnóstico de anemia ferropénica ou a identificação de deficiência férrica antes mesmo de uma anemia é um processo desafiante, pois é necessário avaliar vários parâmetros bioquímicos simultaneamente para um diagnóstico correto devido à complexidade do metabolismo do ferro, sendo que muitos destes parâmetros são afetados por motivos externos à patologia. A identificação de fatores precoces de ferropénia é de extrema relevância de forma a prevenir a anemia ferropénica. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar se os novos parâmetros fornecidos pelo equipamento hematológico Beckman Coulter DxH800, mais concretamente o *low haemoglobin density* e *microcytic anemia factor* poderão ser utilizados como parâmetros precoces de uma anemia por deficiência de ferro. De forma retrospectiva foram estudadas 367 amostras entre 2018 e 2019 provenientes do serviço de Imunohemoterapia. No total temos 190 (51,8%) amostras do sexo feminino e 177 (48,2%) do sexo masculino. A maioria dos pacientes encontra-se na faixa etária dos 35 aos 65 anos, sendo os idosos (> 65 anos) a segunda faixa etária mais prevalente. Os jovens adultos representam apenas 11,7% da população em estudo. As populações foram separadas em população com anemia e população sem anemia em ambos os sexos através do parâmetro hemoglobina (<12 g/dL para mulheres e <13 g/dL para homens). Numa segunda fase, ambos os sexos foram separados em função da ferritina (<100 ng/mL) de forma a definir 2 grupos distintos: com ferropénia e sem ferropénia. Cerca de 30% das mulheres e 26,6% dos homens apresentam anemia, e 93,7% das mulheres e 41,2% dos homens apresentam ferropénia. O LHD em pessoas com anemia apresenta valores mais elevados do que em pessoas sem anemia, no entanto não ultrapassa os valores de referência, já o Maf, na presença de anemia diminui, ficando abaixo dos valores de referência. O LHD apresentou 34,2% de especificidade e 73,2% de sensibilidade. O Maf apresentou 79,7% de especificidade e 56,9% de sensibilidade. Concluiu-se que estes parâmetros podem ser usados para identificar situações de ferropénia, em associação com os parâmetros já utilizados na prática clínica, sendo mais um contributo para a identificação destas situações.

## **Palavras-chave**

Anemia;ferro;*low haemoglobin density*;microcytic anemia factor;parâmetros.

# Abstract

Iron deficiency anaemia affects thousands of people worldwide being the women the largest group of affected people. This form of anaemia is characterized by lack of iron in our organism due to a decreased consumption of iron in our diet, an increased consumption of iron by our metabolism or even in cases with high blood loss or chronic inflammation. The diagnosis of iron deficiency anaemia or even the iron deficiency alone is a tricky process as a result of the complexity characterized by iron metabolism. The identification of premature parameters of iron deficiency extremely important to prevent iron deficiency anemia. Thus, our goal with this project is to research the involvement of the new red blood cells parameters such as LHD and Maf, given by haematologic analyser Beckman Coulter DxH800, as previous markers of iron deficiency anaemia. To achieve this goal, we verified whether the new parameters provided by the Beckman Coulter DxH800 haematological equipment, specifically the low haemoglobin density and microcytic anemia factor, could be used as early parameters of iron deficiency anemia. Retrospectively we studied 367 samples between 2018 and 2019 from the immunohemotherapy appointment. A total of 190 (51,8%) samples were from females and 177 (48,2%) samples were from males. The majority of patients is between 35 and 65 years old, being the elderly (> 65 years old) the second age group most prevalent. The young adults represent only 11,7% of the study population. The samples were separated by anaemic or not anaemic in both sexes through haemoglobin (<12 g/dL in women and <13 g/dL in men). In a second stage, both sexes were separated by the value of ferritin (< 100 ng/mL) so we could form 2 distinct groups: with iron deficiency or without iron deficiency. About 30,0% of women and 41,% of men have iron deficiency. LHD is higher in people with anaemia than people without anaemia, however the values of LHD does not exceed the reference levels. Maf in the presence of anaemia has lower values, being above the reference levels. LHD has 34,2% of specificity and 73,2% sensibility. Maf has 79,7% of specificity and 56,9% of sensibility. In conclusion, these parameters have some differences between the groups, yet they cannot be considered as early parameters of iron deficiency anaemia. In conclusion this parameters can be used on clinical practice, being another assistance to identify these situations.

# Keywords

Anaemia;iron;low haemoglobin density;microcytic anaemia factor;parameters.

# Índice

Objetivo Geral.....	1
Capítulo 1: Projeto de Investigação .....	3
1. Introdução .....	3
1.1. Hematopoiese: Eritropoiese.....	3
1.2. Hemoglobina .....	4
1.3. Caracterização de anemia .....	4
1.3.1. Anemia por deficiência de ferro.....	5
1.3.2. Metabolismo do ferro .....	5
1.3.3. Epidemiologia .....	6
1.3.4. Etiologia .....	7
1.3.4.1. Anemia Ferropénica Absoluta.....	7
1.3.4.2. Anemia Ferropénica Funcional .....	7
1.3.5. Apresentação Clínica .....	8
1.3.6. Diagnóstico .....	9
1.3.6.1. Ferritina .....	9
1.3.6.2. Parâmetros Férricos.....	10
1.3.6.3. Hemoglobina Corpuscular Média e Volume Corpuscular Médio... 10	
1.3.6.4. <i>Red Cell Distribution Width</i> .....	10
1.3.6.5. Determinação do recetor solúvel da transferrina .....	10
1.3.7. Tratamentos.....	11
1.4. Novos Parâmetros Eritrocitários.....	12
1.4.1. <i>Low Haemoglobin Density</i> : LHD.....	12
1.4.2. <i>Microcytic Anemia Factor</i> : Maf.....	12
2. Objetivo .....	15
3. Material e Métodos .....	17
3.1. Recolha de Dados .....	17
3.2. Processamento de Amostras .....	18
3.3. Análise Estatística .....	18
4. Resultados.....	21
4.1. Caracterização da Amostra.....	21

4.1.1. Sexo Feminino .....	21
4.1.1.1. Anemia vs. Sem Anemia .....	21
4.1.1.1.1. Correlação de <i>Spearman's</i> .....	23
4.1.1.1.2. Gráficos de Dispersão.....	24
4.1.1.2. Ferropénia vs. Sem Ferropénia .....	28
4.1.1.2.1. Correlação de <i>Spearman's</i> .....	29
4.1.1.2.2. Gráficos de Dispersão.....	31
4.1.2. Sexo Masculino .....	36
4.1.2.1. Anemia vs. Sem Anemia .....	36
4.1.2.1.1. Correlação de <i>Spearman's</i> .....	37
4.1.2.1.2. Gráficos de Dispersão.....	38
4.1.2.2. Ferropénia vs. Sem Ferropénia .....	43
4.1.2.2.1. Correlação de <i>Spearman's</i> .....	44
4.1.2.2.2. Gráficos de Dispersão.....	46
4.2. Especificidade e Sensibilidade.....	53
5. Discussão de Resultados .....	54
6. Conclusão e Perspetivas futuras .....	59
 Capítulo 2: Relatório de Estágio .....	 61
1. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica .....	61
2. Procedimento Analítico.....	61
2.1. Fase Pré-Analítica.....	61
2.2. Fase Analítica.....	62
2.3. Fase Pós-Analítica .....	64
3. Laboratório de Imunoquímica.....	65
3.1. Química Analítica .....	65
3.1.1. Cobas® Serie 8000.....	65
3.1.2. <i>Abbott Architect i2000SR</i> .....	67
3.1.3. <i>Atellica® NEPH 630 System</i> .....	67
3.2. Testes Imunológicos .....	68
3.2.1. ImmunoCAP™ 250.....	68

3.3.	Eletroforese de Proteínas Séricas .....	68
3.3.1.	Sebia CAPILLARYS 3 OCTA .....	69
3.3.2.	Sebia HYDRASIS Focusing .....	69
3.4.	Virologia.....	71
3.4.1.	Sistema Cobas® 4800 .....	71
3.5.	Testes de Imunofluorescência .....	72
3.5.1.	Pesquisa de <i>Coxiella burneti</i> I+II IFA IgG/IgM.....	72
3.5.2.	Pesquisa de <i>Rickettsia conorii</i> IFA IgG .....	72
3.6.	SediMax e AutionMax .....	72
3.7.	Testes Rápidos.....	73
3.7.1.	Pesquisa de Drogas de Abuso .....	73
3.7.2.	Teste de Gravidez.....	73
4.	Laboratório de Microbiologia.....	75
4.1.	Análise Microscópica .....	75
4.1.1.	Coloração de Gram .....	75
4.1.2.	Coloração Álcool-Ácido Resistente ( <i>Ziehl-Neelsen</i> ) .....	76
4.2.	Meios de Cultura .....	76
4.2.1.	Meios Líquidos.....	77
4.2.2.	Meios Sólidos.....	77
4.3.	Tipos de Inóculos .....	79
4.4.	Produtos Biológicos.....	80
4.4.1.	Urina.....	80
4.4.2.	Fezes.....	81
4.4.3.	Aparelho Respiratório .....	82
4.4.3.1.	Expetações e Secreções Brônquicas <sup>20</sup> .....	82
4.4.3.2.	Aspirado Brônquico e Lavado Bronco-Alveolar (LBA) <sup>20</sup> .....	83
4.4.4.	Hemoculturas <sup>21, 65</sup> .....	83
4.4.5.	Catéter <sup>20</sup> .....	83
4.4.6.	Exsudado Vaginal e Uretral <sup>44</sup> .....	84
4.4.7.	Exsudado Nasal <sup>56</sup> .....	84
4.4.8.	Outros Produtos em Zaragatoa.....	84
4.4.9.	Líquidos Biológicos .....	85
4.4.9.1.	Líquido Pleural e Ascítico <sup>56</sup> .....	85
4.4.9.2.	Líquido Cefalorraquidiano (LCR) <sup>56</sup> .....	85

4.4.10.	Pús <sup>56</sup> .....	85
4.4.11.	Biópsia <sup>56</sup> .....	85
4.5.	Testes de Identificação e de Sensibilidade aos Antibióticos .....	86
4.5.1.	Testes Manuais .....	86
4.5.2.	Testes Automáticos.....	87
4.6.	Testes Serológicos .....	88
4.6.1.	Teste Rosa Bengala <sup>44,56</sup> .....	88
4.6.2.	Teste Widal-Wright <sup>44,56</sup> .....	88
4.6.3.	VDRL e RPR ( <i>rapid plasma reagin</i> ) <sup>45,56</sup> .....	88
4.7.	Testes de Biologia Molecular .....	89
4.7.1.	Deteção de <i>M. tuberculosis</i> e resistência à rifampicina <sup>69</sup> .....	89
4.7.2.	Deteção de bactérias Gram-Negativas não suscetíveis a carbapenemos <sup>44,70</sup> .....	89
4.7.3.	Deteção de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) <sup>71</sup> ..	89
4.7.4.	Deteção de <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <sup>44,72</sup> .....	90
5.	Laboratório de Hematologia.....	91
5.1.	Análise Microscópica.....	91
5.1.1.	Técnicas de Coloração.....	91
5.1.1.1.	Coloração <i>May-Grunwald/Giemsa</i> <sup>45,73</sup> .....	91
5.1.1.2.	Coloração de <i>Perls</i> <sup>45,73</sup> .....	91
5.1.1.3.	Teste de Falciformação <sup>45,73</sup> .....	92
5.2.	Hemograma.....	92
5.2.1.	Metodologia.....	92
5.2.2.	Eritrograma <sup>75</sup> .....	93
5.2.3.	Leucograma <sup>75</sup> .....	93
5.2.4.	Plaquetograma <sup>75</sup> .....	93
5.3.	Pesquisa de Hemoglobina Glicada, A <sub>2</sub> e Fetal <sup>1,76</sup> .....	93
5.4.	Velocidade de Sedimentação <sup>77,78</sup> .....	94
5.5.	Hemóstase .....	94
5.5.1.	Hemóstase Primária <sup>1,45</sup> .....	95
5.5.2.	Hemóstase Secundária <sup>45,77</sup> .....	95
5.5.3.	Fibrinólise <sup>1,45</sup> .....	96
5.5.4.	Testes de função hemostática <sup>80,81</sup> .....	96
5.6.	Testes de Biologia Molecular .....	97

5.6.1. Teste Xpert® HemosIL FII & FV <sup>82</sup> .....	97
5.6.2. Teste Xpert® BCR-ABL Ultra <sup>83</sup> .....	98
5.7. Citometria de Fluxo <sup>84,85</sup> .....	98
Bibliografia .....	101



# Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura do grupo heme presente na hemoglobina.....	4
Figura 2- Representação do metabolismo do ferro e sua distribuição no organismo.....	6
Figura 3- Várias etiologias da anemia ferropénica. ....	8
Figura 4- Sintomas associados à anemia ferropénica. ....	9
Figura 5- Distribuição da amostra em estudo por faixas etárias.....	21
Figura 6- Caracterização da amostra em estudo pela presença ou ausência de anemia.....	22
Figura 7- Gráfico de dispersão de pontos LHD <i>vs.</i> VCM. ....	24
Figura 8- Gráfico de dispersão de pontos LHD <i>vs.</i> Recetor Solúvel da Transferrina. ...	24
Figura 9- Gráfico de dispersão de pontos LHD <i>vs.</i> Hemoglobina.....	24
Figura 10- Gráfico de dispersão de pontos LHD <i>vs.</i> Maf. ....	25
Figura 11- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Ferro em pacientes sem anemia. .....	25
Figura 12- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Saturação da Transferrina em pacientes sem anemia. ....	25
Figura 13- Gráfico de dispersão de pontos Maf <i>vs.</i> VCM. ....	26
Figura 14- Gráfico de dispersão de pontos Maf <i>vs.</i> Recetor Solúvel da Transferrina.. ..	26
Figura 15- Gráfico de dispersão de pontos Maf <i>vs.</i> Hemoglobina.....	26
Figura 16- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Ferritina.. ....	27
Figura 17- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Ferro. ....	27
Figura 18- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Saturação da Transferrina.. .....	27
Figura 19- Representação gráfica da caracterização das amostras femininas em função da deficiência de ferro.....	28
Figura 20- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD <i>vs.</i> Hemoglobina .....	31
Figura 21- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD <i>vs.</i> VCM. ....	31
Figura 22- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD <i>vs.</i> Recetor solúvel da transferrina.....	31
Figura 23- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD <i>vs.</i> Maf.....	32
Figura 24- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD <i>vs.</i> Ferro em pacientes sem anemia. ....	32
Figura 25- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD <i>vs.</i> Saturação da transferrina em pacientes sem anemia. ....	32

Figura 26- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf <i>vs.</i> Hemoglobina.....	33
Figura 27- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf <i>vs.</i> VCM. ....	33
Figura 28- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf <i>vs.</i> Ferro.....	33
Figura 29- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf <i>vs.</i> Recetor solúvel da transferrina. ....	34
Figura 30- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf <i>vs.</i> Saturação da transferrina.....	34
Figura 31- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf <i>vs.</i> Ferritina em pacientes com anemia. ....	34
Figura 32- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes sem ferropénia de Maf <i>vs.</i> Hemoglobina em pacientes sem anemia.....	35
Figura 33- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes sem ferropénia de Maf <i>vs.</i> VCM em pacientes sem anemia. ....	35
Figura 34- Caracterização da amostra em estudo pela presença ou ausência de anemia. ....	36
Figura 35- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> VCM. ....	38
Figura 36- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Ferritina.....	38
Figura 37- Gráfico de dispersão de pontos LHD <i>vs.</i> Ferro .....	38
Figura 38- Gráfico de dispersão de pontos LHD <i>vs.</i> Recetor Solúvel da Transferrina...39	
Figura 39- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Maf.....	39
Figura 40- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Saturação da transferrina.....	39
Figura 41- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Hemoglobina em pacientes sem anemia. ....	40
Figura 42- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Transferrina em pacientes com anemia. ....	40
Figura 43- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Hemoglobina.....	40
Figura 44- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> VCM.....	41
Figura 45- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> VCM.....	41
Figura 46- Gráfico de dispersão de pontos Maf <i>vs.</i> Maf. ....	41
Figura 47- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Recetor Solúvel da transferrina.. ....	42
Figura 48- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Saturação da transferrina. ....	42
Figura 49- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Transferrina em paciente sem anemia. ....	42

Figura 50- Representação gráfica da caracterização das amostras femininas em função da deficiência de ferro.....	43
Figura 51- Gráfico de dispersão de pontos LHD <i>vs.</i> VCM.....	46
Figura 52- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Ferritina.....	46
Figura 53- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Ferro.....	46
Figura 54- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Recetor solúvel da transferrina.....	47
Figura 55- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Maf.....	47
Figura 56- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Saturação da transferrina.....	47
Figura 57- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Transferrina em pacientes com anemia.....	48
Figura 58- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Hemoglobina.....	48
Figura 59- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> VCM.....	48
Figura 60- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Ferritina.....	49
Figura 61- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Ferro.....	49
Figura 62- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Recetor solúvel da transferrina.....	49
Figura 63- Representação gráfica da correlação de Spearman's de Maf <i>vs.</i> Saturação transferrina.....	50
Figura 64- Representação gráfica da correlação de Spearman's de Maf <i>vs.</i> Transferrina em pacientes sem anemia.....	50
Figura 65- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Recetor solúvel da transferrina em pacientes com anemia.....	50
Figura 66- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Saturação da transferrina em pacientes sem anemia.....	51
Figura 67- Gráfico de dispersão de pontos de LHD <i>vs.</i> Transferrina em pacientes sem anemia.....	51
Figura 68- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Hemoglobina.....	51
Figura 69- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> VCM.....	52
Figura 70- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Ferro em pacientes sem anemia.....	52
Figura 73- Gráfico de dispersão de pontos de Maf <i>vs.</i> Saturação da transferrina em pacientes sem anemia.....	52
Figura 74- Representação do sistema pré-analítico Cobas® p612.....	62
Figura 75- Representação do Cobas® Serie 8000.....	65
Figura 74- Exemplo de um gel de Imunofixação Sérica.....	69
Figura 75- (A) Exemplo de uma imunofixação em gel para perfil urinário.....	71
Figura 76- Diferenças entre bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas.....	76

Figura 77- Representação de inóculo por esgotamento.....	80
Figura 78- Imagem representativa da cascata de coagulação.....	96
Figura 79- Representação dos componentes de um citómetro de fluxo.....	98

## Lista de Tabelas

Tabela 1- Tabela de resumo do diagnóstico da anemia ferropénica.....	11
Tabela 2- Representação dos <i>P value</i> obtidos .....	19
Tabela 3- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo .....	22
Tabela 4- Resultados da Correlação de <i>Spearman's</i> entre os parâmetros LHD e Maf..	23
Tabela 5- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo .....	29
Tabela 6- Resultados da Correlação de <i>Spearman's</i> entre os parâmetros LHD e Maf..	30
Tabela 7- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo .....	36
Tabela 8- Resultados da correlação de <i>Spearman's</i> entre os parâmetros LHD e Maf com os restantes nos grupos com e sem anemia. ....	37
Tabela 9- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo .....	44
Tabela 10- Resultados da Correlação de <i>Spearman's</i> entre os parâmetros LHD e Maf com os restantes nos grupos com e sem. ....	45
Tabela 11- Valores de sensibilidade e especificidade calculados para os parâmetros LHD e Maf. ....	53
Tabela 12- Meios de cultura líquidos utilizados .....	77
Tabela 13- Meios de cultura sólidos <i>in vitro</i> utilizados .....	77



## Lista de Acrónimos

ADP	Adenosina Difosfato
AL	Anticoagulante Lúpico
B.A.A.R.	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
C <sub>3</sub>	Componente 3 do Complemento
C <sub>4</sub>	Componente 4 do Complemento
CBC	Contagem de Células Sanguíneas
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CTLF	Capacidade Total de Ligação Férrica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotidos fosfatados
ECL	Electroquimioluminescência
EIA	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FDPs	Produtos de Degradação da Fibrina
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
GDH	Glutamato Desidrogenase
hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCV	Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Coluna Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência
HPV	Vírus do Papiloma Humano
IFA	Imunofluorescência Indireta
INSA	Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge
LBA	Lavado Bronco-Alveolar
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LH	Hormona luteinizante
LHD	<i>Low Haemoglobin Density</i>

LMC	Leucemia Mielóide Crónica
MAF	<i>Microcytic Anemia Factor</i>
MCHC	Concentração de Hemoglobina Celular
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NEQAS	<i>United Kingdom National External Quality Assessment</i>
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NRBC	Células Sanguíneas Nucleadas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RPR	<i>Rapid Plasma Reagin</i>
SEQC	Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratórios
SHBG	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
SPC	Serviço de Patologia Clínica
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TF	Fator Tecidual
THC	Tetrahidrocannabinol
TSH	<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio
VS	Velocidade de Sedimentação
VWF	Fator <i>von Willebrand</i>

# Objetivo Geral

Durante o período de 15 de setembro de 2020 a 17 de maio de 2021 tive como objetivos principais o desenvolvimento de um trabalho prático apresentado sob a forma de relatório de estágio, no qual me foi permitido o contacto direto com determinadas práticas laboratoriais, e a elaboração de um projeto de investigação. Neste projeto abordei os novos parâmetros hematológicos *low haemoglobin density* e *microcytic anaemia factor* e estudei de que forma estes podem ser fatores precoces de anemia ferropénica. Relativamente ao relatório de estágio realizado no serviço de patologia clínica (SPC) no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB), este apenas expõe a minha experiência laboratorial, servindo como comprovativo das capacidades adquiridas, não sendo sujeito a avaliação.



# Capítulo 1: Projeto de Investigação

## 1. Introdução

### 1.1. Hematopoiese: Eritropoiese

O termo hematopoiese corresponde ao processo de formação de células sanguíneas. Estas originam-se através de células estaminais pluripotentes existentes na medula óssea, que se replicam por mitose: a cada divisão uma célula-mãe origina uma célula filha pluripotente e outra que será diferenciada<sup>1</sup>. Esta diferenciação resulta da existência de fatores de crescimento específicos que se ligam a recetores celulares produzindo uma cascata de reações, em que são ativados genes que estimulam esta diferenciação. Da divisão e da diferenciação das células estaminais resultam eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e ainda os linfócitos (B e T)<sup>1</sup>.

O processo de produção e diferenciação dos eritrócitos ou glóbulos vermelhos designa-se eritropoiese, as células estaminais são diferenciadas em várias células progenitoras até se diferenciar em proeritroblasto<sup>1</sup>. O proeritroblasto é o primeiro precursor eritróide existente na medula óssea, que após divisões sucessivas se diferencia em eritroblasto e este em reticulócito quando o núcleo é expelido. Por fim, ocorre a maturação do reticulócito formando o eritrócito maduro, célula anucleada em forma de disco bicôncavo.

Para um bom funcionamento eritrocitário, o eritrócito deverá conseguir atravessar capilares, manter a hemoglobina em forma reduzida e manter o equilíbrio osmótico. Esta célula tem um tempo de vida de 120 dias, sendo depois fagocitada pelo reticulo endoplasmático. Após destruição do eritrócito o ferro irá ser reutilizado, ligando-se de novo à transferrina e sendo assim transportado para a medula óssea de forma incorporar novos eritrócitos. Desta forma, o processo de eritropoiese está assegurado<sup>1,2</sup>. A eritropoiese é regulada pela hormona a eritropoetina. O nível desta hormona aumenta quando, por algum motivo (metabólico ou estrutural), o O<sub>2</sub> atmosférico está diminuído<sup>1</sup>.

## 1.2. Hemoglobina

Os eritrócitos são células essenciais ao nosso organismo, controlam as trocas gasosas: transportam  $O_2$  desde os pulmões aos órgãos e tecidos e  $CO_2$  dos tecidos para os pulmões<sup>1</sup>. O que permite aos eritrócitos realizar as trocas gasosas é a proteína especializada hemoglobina: a hemoglobina normal de um adulto consiste em quatro cadeias polipeptídicas  $\alpha_2\beta_2$ , cada uma delas ligadas a um grupo heme (figura 1)<sup>1</sup>. O grupo heme é sintetizado na mitocôndria através de uma cascata de reações que começam pela condensação de glicina com succinil-coenzima A, obtendo-se no final, a protoporfirina<sup>1</sup>. Esta após combinação com ferro ( $Fe^{2+}$ ) forma o grupo heme. Cada grupo heme formado irá combinar-se com uma cadeia de globina, formando a hemoglobina.

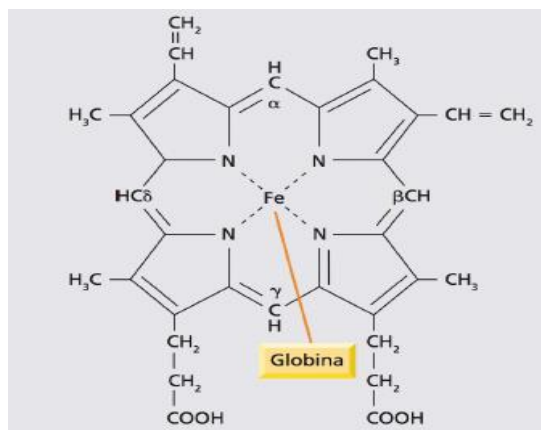


Figura 1- Estrutura do grupo heme presente na hemoglobina (Figura adaptada de Hoffbrand & Moss, 2013)<sup>1</sup>.

## 1.3. Caracterização de anemia

A anemia é uma diminuição dos níveis de hemoglobina em relação aos valores de referência de acordo com o sexo (<12 g/L em mulheres e <13 g/L em homens)<sup>3</sup>. Existem três tipos principais de anemia considerando os níveis hematimétricos: anemia microcítica, anemia macrocítica e anemia normocítica<sup>1</sup>. Para um bom diagnóstico de anemia, é essencial analisar dois parâmetros, o volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM)<sup>1</sup>. Quando ambos estão abaixo dos valores de referência estamos perante uma anemia microcítica, quando o VCM é normal, mas o HCM é elevado, então será uma anemia normocítica, e quando temos o VCM alto, nesse caso, será uma anemia macrocítica<sup>1</sup>. É de realçar que dentro das três principais caracterizações de anemia, existem várias causas bem como outras anemias associadas (anemia hemolítica inserida na categoria de anemias normocítica, por exemplo). Desta forma, é necessário utilizar outros parâmetros analíticos e clínicos para auxílio de uma

correta identificação da anemia, como o número de reticulócitos, a morfologia dos eritrócitos ou os sintomas apresentados pelo paciente.

### **1.3.1. Anemia por deficiência de ferro**

A anemia é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a deficiência de ferro a principal causa das anemias diagnosticadas e a primeira causa de anemias em mulheres<sup>4</sup>. Este tipo de anemia causada pela falta de ferro (anemia ferropénica) está inserida no grande grupo das anemias microcíticas, em que tanto o HCM como o VCM estão diminuídos. Também está caracterizada como sendo uma anemia hipocrômica dado que os eritrócitos existentes são pequenos e pálidos devido à deficiência de ferro que compromete a síntese da hemoglobina.

### **1.3.2. Metabolismo do ferro**

O ferro é um ião necessário para o metabolismo normal do corpo humano, é encontrado em diferentes alimentos, sendo a carne a fonte mais rica<sup>5</sup>. Na nossa dieta, o ferro ingerido está sob a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) sendo necessário ser reduzido para forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) através do suco gástrico<sup>5</sup>. O ferro não absorvido é eliminado pelas fezes, urina e cabelo<sup>1</sup>. Maior parte da absorção do ferro é realizada no duodeno e através de três proteínas é transportado e armazenado: transferrina, recetor solúvel da transferrina e ferritina (Figura 2). A transferrina vai conduzir o ferro aos tecidos que possuem recetores de transferrina, como por exemplo, os eritroblastos existentes na medula óssea<sup>5</sup>. A ferritina serve como depósito de ferro nos macrófagos e recebe ferro que, por exemplo, está ligado à hemoglobina em eritrócitos senescentes de forma a que este seja reutilizado<sup>5</sup>. Esta reutilização do ferro só é finalizada quando o ferro existente na ferritina é transferido para a transferrina para ser utilizado na formação de novos eritrócitos<sup>5</sup>.

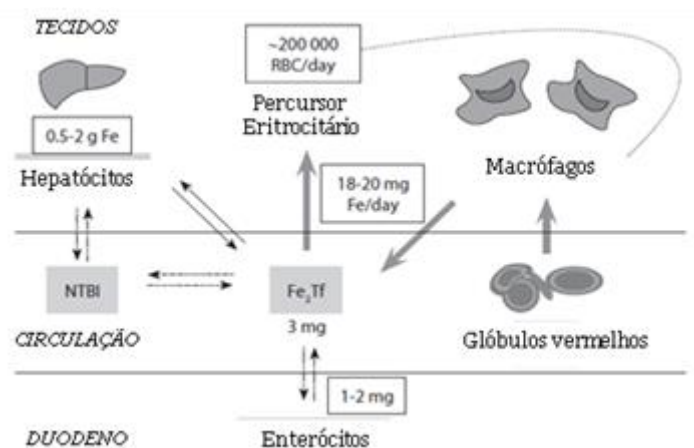


Figura 2- Representação do metabolismo do ferro e sua distribuição no organismo. Grande parte do ferro pertence à hemoglobina eritrocitária (60-70%). Cerca de 20 a 30% do ferro no corpo está armazenado sob a forma de ferritina nos hepatócitos e nos macrófagos. A medula óssea é a principal consumidora de ferro, utilizando entre 18 a 20 mg de ferro para a síntese de hemoglobina em 200 bilhões de novos eritrócitos todos os dias. Normalmente, por pessoa, são absorvidos entre 1 a 2 mg de ferro o que é suficiente para compensar o ferro que é utilizado. NTBI- ferro não ligado à transferrina; RBCs - glóbulos vermelhos; Tf - transferrina. Imagem adaptada de Tandara L & Salamunic I, 2012<sup>6</sup>.

Existe outra proteína essencial ao metabolismo do ferro, a hepcidina. Esta proteína é essencial na regulação do ferro, pois inibe a libertação deste dos macrófagos através da regulação da ferroportina (proteína exportadora de ferro extracelular)<sup>5</sup>. A síntese desta proteína é estimulada através do aumento de ferro no organismo e é inibida devido a uma deficiência de ferro, hipóxia e ao aumento da eritropoiese<sup>5</sup>.

### 1.3.3. Epidemiologia

A deficiência de ferro é a doença nutricional que mais pessoas afeta globalmente, sendo os países da Ásia e a América Latina os mais afectados<sup>4</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 42% de crianças, 29% de mulheres não-grávidas e 38% de mulheres grávidas sofrem de deficiência férrica. Estes números não representam exatamente a prevalência da anemia ferropénica pois são poucos os estudos populacionais realizados, permanecendo a prevalência da anemia ferropénica incerta<sup>7</sup>. Sabe-se, no entanto, que a anemia associada à deficiência de ferro é um problema maior para crianças e mulheres independente do seu estatuto socio-económico<sup>7</sup>.

Relativamente a Portugal, segundo um estudo realizado em 2015, cerca de 19,8% da população sofre de anemia dos quais 5,8% devido a deficiência de ferro<sup>8</sup>. Com este estudo descobriu-se também que 84% da população não tinha conhecimento da anemia nem realizava qualquer tratamento<sup>8</sup>. Em Portugal os grupos que poderão estar mais

propícios a uma anemia ferropénica são as mulheres grávidas ou com idade inferior a 15 anos, ou pacientes que tenham insuficiência cardíaca congestiva<sup>8</sup>.

#### **1.3.4. Etiologia**

As causas para a deficiência férrica que origina uma anemia ferropénica, podem ser de origem genética, ambiental ou de causa fisiológica<sup>9</sup>. Para uma melhor compreensão da causa de deficiências de ferro, dividiu-se em dois grandes grupos: anemia ferropénica absoluta e anemia ferropénica funcional<sup>9</sup>. É importante compreender que a deficiência de ferro (absoluta ou funcional), pode existir mesmo não existindo um quadro clínico de anemia instalado (definido pela quantidade de hemoglobina).

##### **1.3.4.1. Anemia Ferropénica Absoluta**

Este subgrupo refere-se à redução total das células capazes de armazenar ferro, como os macrófagos ou os hepatócitos<sup>9</sup>. Pode ter várias origens como um aumento da necessidade de ferro, uma diminuição do consumo do ferro, má absorção ou ainda perda de sangue crónica<sup>9</sup>. Como podemos observar na Figura 3, existem vários comportamentos pelos quais existe esta redução do armazenamento do ferro<sup>9</sup>.

##### **1.3.4.2. Anemia Ferropénica Funcional**

O termo funcional é usado para descrever duas situações principais: quando o ferro é mobilizado com dificuldade do armazenamento, situado no fígado, baço e medula óssea, para o plasma ou num cenário de elevada eritropoiese levando a um desequilíbrio entre o consumo de ferro necessário e o ferro fornecido. Neste subgrupo é essencial frisar que as reservas de ferro podem estar normais ou altas, ao contrário da anemia ferropénica absoluta. Na Figura 3 apresentamos as causas de anemia ferropénica funcional.



Figura 3- Várias etiologias da anemia ferropénica. Figura adaptada de Cappellini *et al*, 2020<sup>9</sup>.

### 1.3.5. Apresentação Clínica

Os sintomas da anemia ferropénica são variados, além de muitos estarem também presentes noutro tipo de anemias<sup>4</sup>. A maior parte das características clínicas depende do quão severa é a fase da anemia, bem como da idade, afetando negativamente o desenvolvimento e a qualidade de vida do paciente<sup>4</sup>.

A anemia ferropénica está associada a uma diminuição da capacidade cognitiva em crianças e à diminuição da capacidade física em adultos<sup>9</sup>. Os sintomas mais frequentes são a palidez, a fadiga, a dispneia, cefaleias pele seca e cabelo estragado, bem como taquicardias (Figura 4).

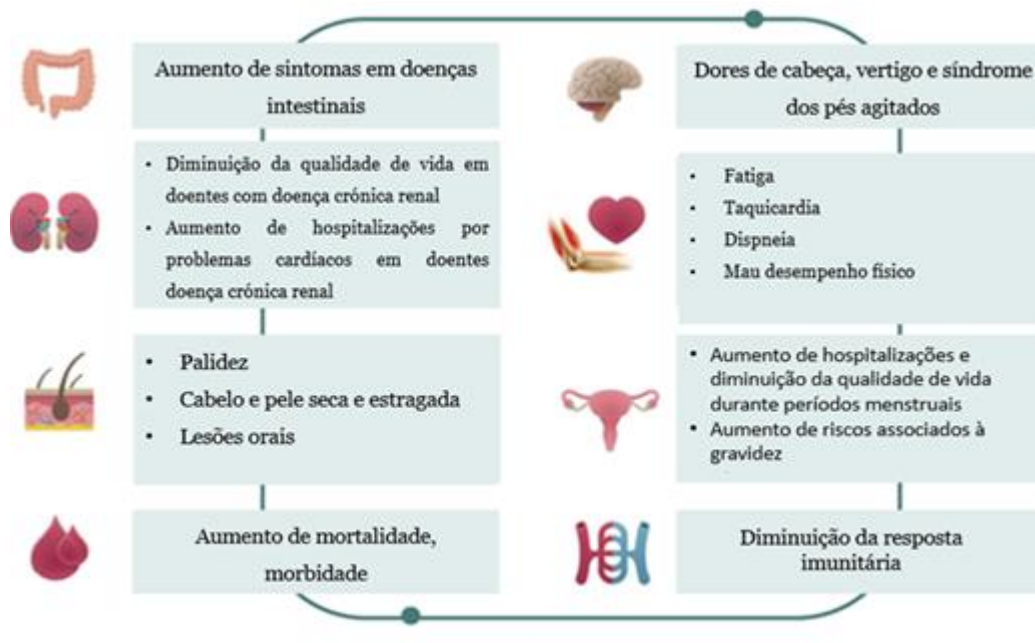


Figura 4- Sintomas associados à anemia ferropénica. Figura adaptada de Cappellini *et al*, 2020<sup>9</sup>.

### 1.3.6. Diagnóstico

Para o diagnóstico de uma anemia microcítica hipocrómica os valores de hemoglobina devem ser menores que 13 g/dL para homens e menores que 12 g/dL em mulheres<sup>3</sup>. Para a confirmação é necessário analisar alguns fatores: a ferritina, fatores férricos (nível de ferro sérico, saturação da transferrina, capacidade total de ligação de ferro (TIBC) ou concentração de transferrina), VCM e HCM, distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) e determinação do recetor solúvel da transferrina<sup>10</sup>.

#### 1.3.6.1. Ferritina

A ferritina é o teste mais reconhecido para avaliar o ferro armazenado. Apesar de ser o parâmetro que melhor identifica as situações de deficiência férrica, que antecedem à instalação clínica da anemia ferropénica é um parâmetro influenciado pela inflamação crónica ou infeção. Em situações de inflamação, os valores de ferritina aumentam, mesmo existindo anemia, o que pode resultar num falso diagnóstico<sup>10</sup>. Este aumento durante a inflamação ocorre devido a uma maior libertação de citocinas (IL-6, por exemplo), amplificando a expressão da hepcidina<sup>10</sup>. Como dito anteriormente, a hepcidina regula a libertação de ferro das células pela internalização do transportador (ferroportina), aumentando então os valores de ferritina<sup>10</sup>. Na ausência de inflamação crónica ou infeção, em situações de ferropénia encontra-se abaixo do valor de referência (100 ng/mL ou entre 100-300 ng/mL e a saturação de transferrina inferior a 20%)<sup>3,4</sup>

### **1.3.6.2. Parâmetros Férricos**

Nos parâmetros férricos estão incluídos os níveis de ferro sérico, saturação e concentração sérica da transferrina e capacidade total de ligação férrica (CTLF). O ferro sérico, na corrente sanguínea é transportado pela transferrina. A CTLF é a percentagem referente à saturação da transferrina (máximo de ferro que se poderá ligar à transferrina)<sup>10</sup>. Numa anemia ferropénica tanto a saturação da transferrina como o ferro sérico estão diminuídos, no entanto a CTLF e a concentração férrica da transferrina aumentam numa tentativa de compensar os valores baixos de ferro sérico<sup>10</sup>.

### **1.3.6.3. Hemoglobina Corpuscular Média e Volume Corpuscular Médio**

Estes dois valores hematimétricos são sensíveis para a anemia ferropénica quando não existe deficiência de B12 ou ácido fólico, no entanto também podem estar reduzidos numa anemia sideroblástica<sup>10</sup>.

### **1.3.6.4. *Red Cell Distribution Width***

*Red cell distribution width* (RDW) avalia a variação de tamanho entre os glóbulos vermelhos. Este parâmetro mede o diâmetro dos eritrócitos, sendo o diâmetro normal de 6-8  $\mu\text{m}$ <sup>10</sup>. No caso de uma anemia por deficiência de ferro, este parâmetro pode estar aumentado<sup>10</sup> devido a uma variação grande de tamanho entre os glóbulos vermelhos.

### **1.3.6.5. Determinação do recetor solúvel da transferrina**

O recetor solúvel da transferrina deriva de uma proteólise da membrana da transferrina, e no caso de uma deficiência férrica, a síntese deste recetor irá estar aumentada<sup>4</sup>. Este parâmetro tem uma vantagem particular: não é afetado por infeções ou inflamações crónicas. Este parâmetro apresenta uma sensibilidade de 86% e uma especificidade de 75%<sup>4</sup>. Em contrapartida, pode estar aumentado devido a uma anemia hemolítica ou a uma leucemia <sup>4</sup>.

Para direcionar o diagnóstico pode ser útil a razão entre o recetor solúvel da transferrina e a ferritina: quando esta razão está baixa a provável causa da anemia será uma doença crónica; quando é elevada será uma anemia ferropénica<sup>4</sup>.

As variações destes parâmetros estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1- Tabela de resumo do diagnóstico da anemia ferropénica.

	<b>Anemia por deficiência de Ferro</b>
<b>VCM/HCM</b>	Diminuído
<b>RDW</b>	Aumentado
<b>Ferro Sérico</b>	Diminuído
<b>Ferritina</b>	Diminuída
<b>Saturação Transferrina</b>	Diminuída
<b>Recetor Solúvel da Transferrina</b>	Aumentado
<b>CTLF</b>	Aumentada

### 1.3.7. Tratamentos

Os tratamentos existentes têm como objetivo aumentar a disponibilidade do ferro no organismo de forma a normalizar as concentrações de hemoglobina e das reservas de ferro<sup>4</sup>. O principal método é a suplementação férrica que pode ser por via oral ou intravenosa<sup>9</sup>. O ferro é encontrado em variados alimentos, como carne, tofu, lentilhas, espinafres, entre outros<sup>5</sup>. No entanto, a introdução de alimentos ricos em ferro na dieta não é suficiente, não ajudando por exemplo, no aumento de reservas férricas no organismo<sup>5</sup>. Desta forma, existem três soluções terapêuticas disponíveis: ingestão de sulfato ferroso, gluconato ferroso ou fumarato ferroso<sup>4</sup>. O uso de ácido ascórbico (vitamina C) também pode ser associado à terapêutica pois aumenta a absorção do ferro<sup>5</sup>.

No entanto, como qualquer terapêutica, existem efeitos secundários associados como náuseas, diarreias, descoloração da pele e desconforto<sup>4,9</sup>. A absorção férrica pode também ser menor, caso exista inflamação<sup>9</sup>.

No caso da suplementação por via intravenosa, esta apresenta algumas vantagens relativamente à suplementação oral, por exemplo, não é afetada pela inflamação, não necessita de administração diária e é mais eficaz. Contudo, as dores nas articulações e o elevado custo são as principais desvantagens<sup>9</sup>. Esta alternativa é aconselhada a pacientes que por algum motivo não obtiveram resultados com a suplementação oral ou pacientes com doenças crónicas (renal e cardíaca)<sup>9</sup>.

## 1.4. Novos Parâmetros Eritrocitários

Um dos desafios do diagnóstico da anemia ferropénica é reconhecer a deficiência de ferro antes mesmo desta provocar anemia, principalmente em doentes com doenças crónicas, em que certos parâmetros podem ser “mascarados” não sendo possível realizar um diagnóstico precoce e correto.

Atualmente sugere-se que novos parâmetros eritrocitários executados por analisadores hematológicos automatizados, podem permitir uma deteção precoce de deficiência férrica. Estes novos parâmetros são o *low haemoglobin density* (LHD) e o *Microcytic Anemia Factor* (Maf) que resultam de fórmulas matemáticas derivadas de parâmetros hematimétricos.

### 1.4.1. *Low Haemoglobin Density*: LHD

Este parâmetro é calculado através do valor da concentração de hemoglobina celular média (MCHC) usando uma transformação sigmoide:

$$\text{LHD}\% = 100 * \sqrt{1 - \left( \frac{1}{1 + e^{1,8(30 - \text{MCHC})}} \right)},$$

determinado pelos analisadores Beckman-Coulter e podendo ser usado com indicador precoce de deficiência férrica pois está relacionado com a disponibilidade férrica para a eritropoiese<sup>11,12</sup>. Está provado que a percentagem de LHD tem uma enorme sensibilidade (95,2%) e especificidade (93,3%)<sup>11</sup> tendo valores de referência em adultos de 1,3%-7,7%<sup>13</sup>. Em pessoas com uma anemia ferropénica este valor tem tendência a aumentar<sup>12</sup>.

Um estudo recente mostrou também a importância do LHD na distinção entre deficiência férrica funcional e absoluta para pacientes com febre mediterrânea familiar, ajudando a evitar tratamentos desnecessários para estes doentes mesmo que os sintomas e aspetos clínicos indiquem deficiência férrica<sup>14</sup>. Este parâmetro está correlacionado com a percentagem de células hipocrómicas existentes<sup>14</sup>.

### 1.4.2. *Microcytic Anemia Factor*: Maf

A *microcytic anemia factor* (Maf) é obtida através do valor de hemoglobina e do VCM ( $\text{Maf} = \frac{\text{Hb} * \text{VCM}}{100}$ ) e está comprovado que este fator tem importância clínica no

diagnóstico precoce em condições específicas como doenças crônicas renais e cardíacas<sup>15</sup>. Em indivíduos saudáveis, o Maf está entre 12,0-15,6, enquanto que em indivíduos com anemia ferropénica apresenta valores mais baixos (3,8-9,9)<sup>15</sup>. Este parâmetro aplicado numa população com deficiência férrica obteve uma sensibilidade de 61,5% e especificidade de 93,0%<sup>15</sup>.



## **2. Objetivos Específicos do Projeto de Investigação**

A anemia ferropénica é identificada por uma diminuição da hemoglobina, parâmetro incluído num hemograma de rotina. No entanto, a identificação da deficiência de ferro que antecede a anemia ferropénica clínica carece de um marcador sensível e específico. Atualmente a ferritina é o parâmetro que melhor auxilia na identificação precoce de ferropénia, mas depende da inflamação e/ou infeção do doente.

O contador hematológico automatizado DxH800 de Beckman Coulter usado no CHUCB fornece novos parâmetros hematológicos nomeadamente o LHD e o Maf. Estes parâmetros atualmente não são disponibilizados ao clínico, resultam de fórmulas matemáticas e com base na bibliografia podem ser usados na identificação precoce da anemia ferropénica. Neste sentido, o objetivo deste projeto é a verificação do valor destes novos parâmetros eritrocitários como parâmetros precoces de uma anemia ferropénica na nossa população de estudo.

A identificação precoce da anemia ferropénica é de extrema importância, permite tomar medidas terapêuticas ou alterar hábitos alimentares de forma a evitar a instalação de uma anemia ferropénica, melhorando a vida dos doentes e antecipando problemas clínicos no futuro.



## 3. Material e Métodos

### 3.1. Recolha de Dados

Foram selecionados da consulta de imunohemoterapia doentes com suspeita de anemia ferropénica ou para seguimento da mesma, durante o período de 2018 e 2019. De cada doente foram recolhidos os valores de hemoglobina, VCM, transferrina, recetor solúvel da transferrina, saturação da transferrina, ferro sérico, ferritina, *Low hemoglobina density* e *Microcytic anemia factor*. Estes dados foram obtidos através do software existente no hospital, o *Modulab*, sendo tratados de forma anónima e com o consentimento da comissão de ética do CHUCB (estudo nº 07/2021).

Deste período foram recolhidos dados de 1733 pacientes. Os pacientes que não realizaram todas os parâmetros necessários para o estudo foram excluídos resultando em 1590 pacientes. Num segundo passo, para os pacientes que frequentaram as consultas mais de uma vez neste período apenas foram consideradas para o estudo a primeira análise realizada e indivíduos com idade superior a 18 anos foram excluídos, obtendo-se assim 473 doentes.

As amostras foram divididas em função do sexo (feminino e masculino). Esta divisão foi realizada tendo em conta que os valores de referência para anemia são diferentes consoante o sexo<sup>9</sup>. Para minimizar o efeito de reações inflamatórias, amostras com ferritina superior a 150 µg/L para mulheres e maior que 400 µg/L para homens<sup>13</sup>, foram excluídas.

No total, foram estudadas 367 amostras, 190 do sexo feminino e 177 do sexo masculino. A média de idades para o sexo feminino foi de 49,8 anos e para o sexo masculino foi de 64,9 anos. Em função do valor de hemoglobina os pacientes foram classificados com anemia ou sem anemia. Com valores inferiores a 12 g/L para mulheres e inferiores a 13 g/L para homens, os doentes são considerados com anemia<sup>3</sup>.

Tendo em conta o objetivo do trabalho, os mesmos doentes foram posteriormente separados em função dos valores de ferritina e de saturação de transferrina para determinação ou não, da existência de deficiência de ferro. Para valores de ferritina inferiores a 100 ng/mL ou entre 100-300 ng/mL e com a saturação de transferrina

inferior a 20%, os pacientes são considerados como ferropénicos<sup>3</sup>. Foram realizados testes de comparação dentro dos grupos (ferropénia e sem ferropénia) para os pacientes com e sem anemia.

No final, foram realizados testes de sensibilidade e especificidade para ambos os parâmetros de forma a comparar com os valores de referência apresentados anteriormente.

### **3.2. Processamento de Amostras**

O hemograma foi realizado pelo equipamento automatizado hematológico *UniCel DxH 800*® (*Beckman Coulter*). Este equipamento determina os parâmetros hematológicos pelo método de Coulter.

As amostras de soro foram processadas pelo analisador químico *Cobas*® 8000 (*Roche Diagnostics*) de forma a obter os seguintes parâmetros bioquímicos: transferrina, o recetor solúvel da transferrina e o ferro sérico. O ferro é calculado através do método fotométrico, a ferritina por electroquimioluminescência e os restantes parâmetros pelo método imunoturbidimétrico. A saturação da transferrina é calculada pelo equipamento através da razão entre o ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro<sup>16</sup>.

### **3.3. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 27 (*IBM Statistics*) para *Windows*. Para determinação da distribuição das variáveis foi usado o teste *Kolmogorov-Smirnov* para um conjunto de amostras superior a 50 e o teste *Shapiro-Wilk* para um conjunto de amostras inferiores a 50. Considerou-se uma amostra com distribuição normal se *P value* >0,05. A maioria das variáveis apresentou uma distribuição não-normal ou não-paramétrica (*P value* <0,05), e por isso foram utilizados testes estatísticos não-paramétricos.

A diferença entre grupos foi obtida através do teste não-paramétrico *Mann-Whitney U* e a correlação entre parâmetros foi obtida através do teste não-paramétrico *Spearman's*. Para um *P value* <0,05 os resultados foram considerados estatisticamente significativos. Devido à heterogeneidade das variáveis relativamente à sua distribuição, utilizou-se a mediana (*percentis 25-75*) para representar valores não-paramétricos. Na tabela 2 estão retratados os *P value* calculados para verificar as distribuições de cada variável.

Tabela 2- Representação dos *P value* obtidos através dos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk* para obtenção da distribuição das variáveis em função do grupo.

	Sexo Feminino		Sexo Masculino	
	Com Anemia (n=57)	Sem Anemia (n=133)	Com Anemia (n=47)	Sem Anemia (n=130)
Hemoglobina	<0,01	<0,01	<0,01	0,05
VCM	0,20	0,20	0,34	0,01
Ferritina	<0,01	<0,01	<0,01	0,02
Ferro	<0,01	0,03	<0,01	0,04
Recetor Solúvel Da Transferrina	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Saturação da Transferrina	0,03	0,02	<0,01	0,01
Transferrina	0,20	0,20	0,56	<0,01
LHD	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Maf	0,10	0,01	0,09	0,20



## 4. Resultados

Entre 2018 e 2019 foram estudadas 1733 amostras no SPC do CHUCB. Com base nos critérios de seleção já referidos, para o estudo foram consideradas 367 amostras. Estas amostras foram distribuídas por dois grupos (feminino e masculino), pela existência ou não de anemia e pela existência ou não de ferropénia. Posteriormente, dentro da presença ou não de uma deficiência férrica, foram também separados e analisados os grupos com e sem anemia.

### 4.1. Caracterização da Amostra

Dos doentes adultos incluídos, 50,9% encontra-se entre os 35 e os 65 anos, 37,3% encontram-se acima dos 65 anos e o grupo dos jovens adultos, entre os 18 e os 35 anos representam apenas 11,7% (Figura 5).

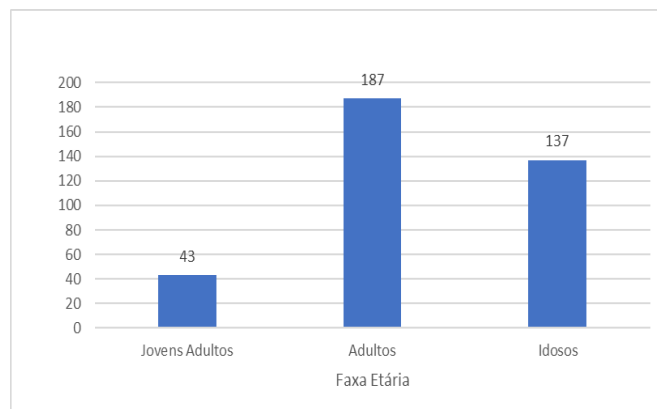


Figura 5- Distribuição da amostra em estudo por faixas etárias. Jovens Adultos: 18 a 35 anos; Adultos: 35 a 65 anos; Idosos: > 65 anos.

#### 4.1.1. Sexo Feminino

##### 4.1.1.1. Anemia vs. Sem Anemia

São 190 amostras sexo feminino, 57 (30,0%) pacientes têm anemia e 133 (70,0%) pacientes não tem anemia (Figura 6).

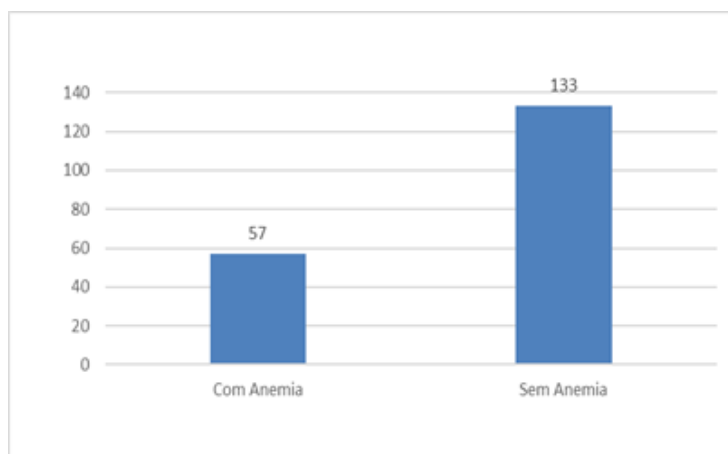


Figura 6- Caracterização da amostra em estudo pela presença ou ausência de anemia.

Para cada um dos nove parâmetros analisados (Hemoglobina, VCM, ferritina, ferro, recetor solúvel da transferrina, LHD, Maf, saturação da transferrina e transferrina) foram determinadas as respectivas medianas e as diferenças entre os grupos em estudo, presentes na tabela 3.

Tabela 3- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo (anemia e sem anemia). *P value* obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney U*. Resultados apresentados em mediana (*percentis* 25-75). \**P value* <0,05.

	Pacientes com Anemia (n = 57)	Pacientes sem Anemia (n = 133)	<i>P value</i>
Hemoglobina	11,3 (10,6-11,8)	13,1 (12,6-13,7)	<0,001*
VCM	80,0 (75,2-85,1)	86,8 (82,3-90,6)	<0,001*
Ferritina	14,0 (7,0-63,4)	29,1 (13,6-54,8)	0,05
Ferro	38,2 (28,5-53,6)	74,1 (51,2-96,2)	<0,001*
Recetor Solúvel da Transferrina	6,2 (4,2-8,8)	3,5 (2,8-4,4)	<0,001*
LHD	7,9 (5,4-14,1)	4,1 (2,7-6,0)	<0,001*
<i>Maf</i>	8,9 (8,0-9,8)	11,3 (10,6-12,2)	<0,001*
Saturação da Transferrina	10,5 (6,0-14,7)	19,2 (12,7-24,5)	<0,001*
Transferrina	301,0 (259,2-337,5)	289,4 (249,0-326,9)	0,41

Doentes com anemia têm valores mais elevados de recetor solúvel da transferrina, LHD e de transferrina, mas valores mais baixos de hemoglobina, VCM, ferritina, ferro, Maf e saturação da transferrina, quando comparado com pessoas sem anemia.

#### 4.1.1.1.1. Correlação de Spearman's

Através da Correlação de Spearman's observou-se a relação existente entre os novos parâmetros analisados e os já estabelecidos para o diagnóstico de anemia ferropénia. Na tabela 4 estão representados os parâmetros que obtiveram uma correlação significativa em conjunto com o *P value* e fator de correlação correspondente.

Tabela 4- Resultados da Correlação de Spearman's entre os parâmetros LHD e Maf com os restantes nos grupos com e sem anemia. Apenas os parâmetros com *P value* < 0,05 foram considerados. Resultados apresentados como *P value* (coeficiente de Correlação).

	LHD		Maf	
	Com Anemia n = 57	Sem Anemia n = 133	Com Anemia n = 57	Sem Anemia n = 133
VCM	<0,001 (-0,68)	<0,001 (-0,46)	<0,001 (0,85)	<0,001 (0,86)
Recetor Solúvel da Transferrina	<0,001 (0,57)	<0,001 (0,42)	<0,001 (-0,59)	<0,001 (-0,49)
Hemoglobina	0,01 (-0,34)	<0,001 (-0,36)	<0,001 (0,81)	<0,001 (0,84)
Ferritina	>0,05	>0,05	0,02 (0,32)	0,01 (0,23)
Ferro	>0,05	0,002 (-0,26)	0,01 (0,36)	<0,001 (0,50)
Saturação da Transferrina	>0,05	0,002 (-0,27)	0,02 (0,31)	<0,001 (0,52)
Maf	<0,001 (-0,59)	<0,001 (-0,47)	-	-
LHD	-	-	<0,001 (-0,59)	<0,001 (-0,47)

#### 4.1.1.1.2. Gráficos de Dispersão

As correlações apresentadas na Tabela 5 com significado estatístico são representadas através de gráfico de dispersão de pontos indicando o respectivo fator de correlação.

- LHD

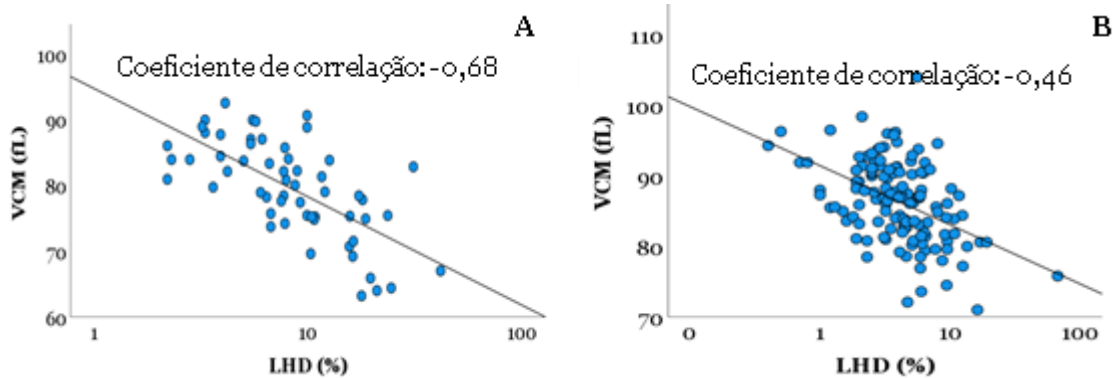


Figura 7- Gráfico de dispersão de pontos LHD vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

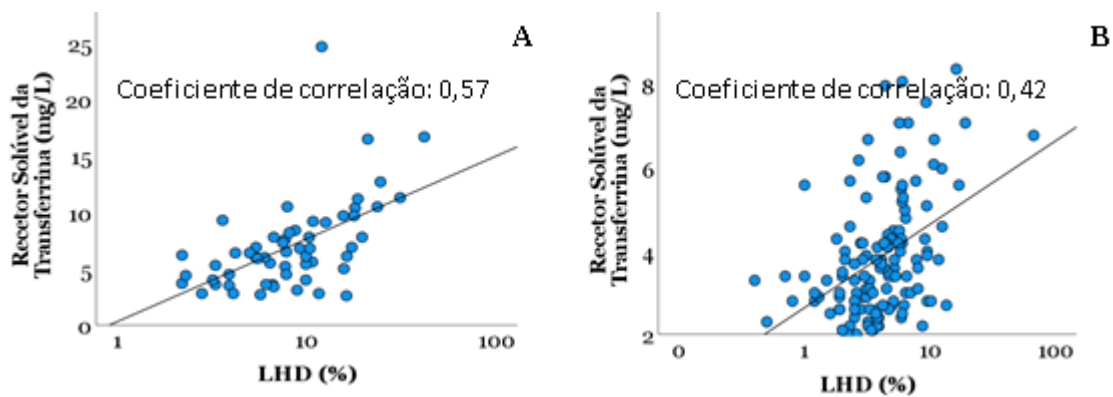


Figura 8- Gráfico de dispersão de pontos LHD vs. Recetor Solúvel da Transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

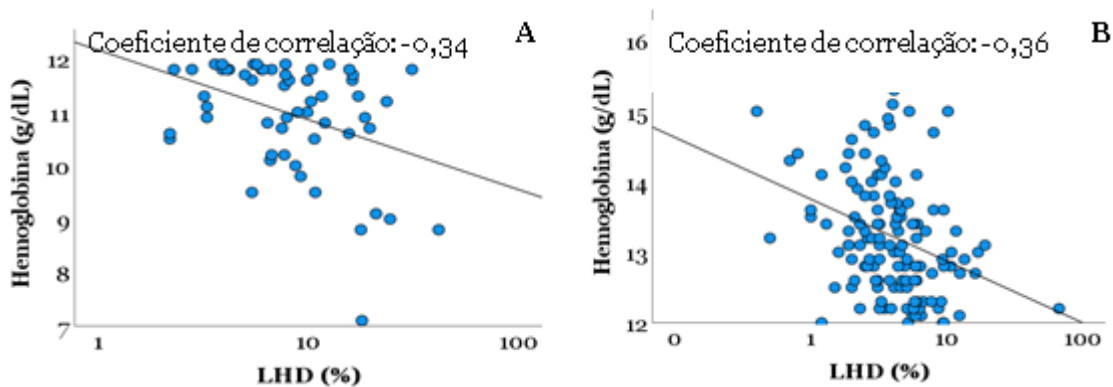


Figura 9- Gráfico de dispersão de pontos LHD vs. Hemoglobina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

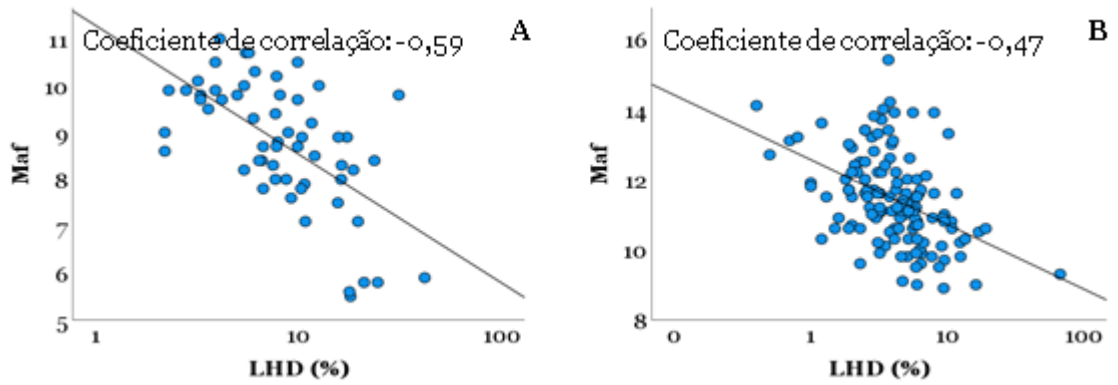


Figura 10- Gráfico de dispersão de pontos LHD vs. Maf. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

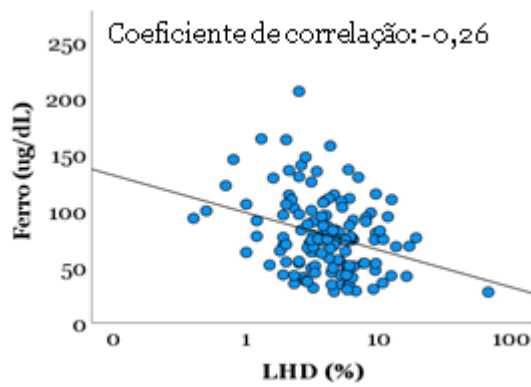


Figura 11- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Ferro em pacientes sem anemia.

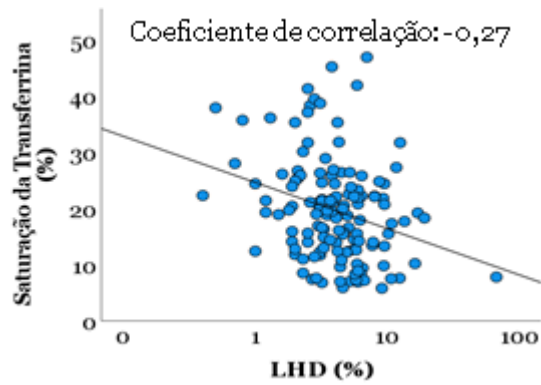


Figura 12- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Saturação da Transferrina em pacientes sem anemia.

- Maf

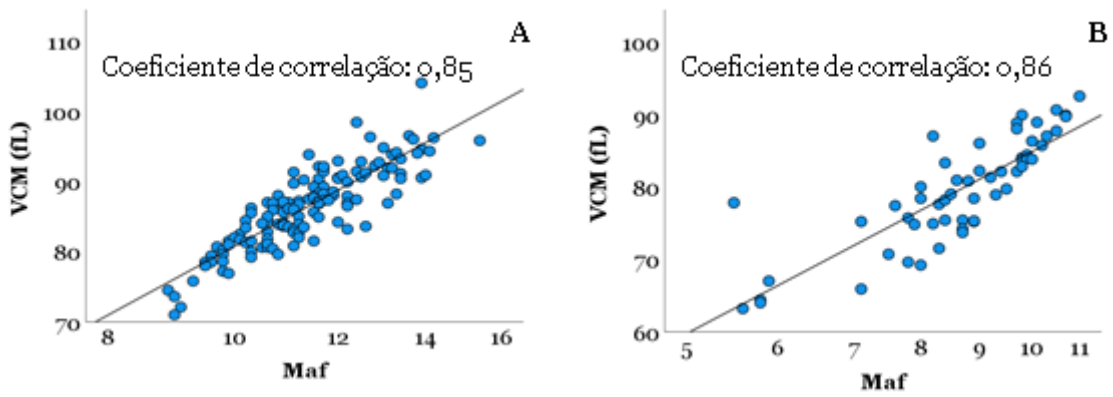


Figura 13- Gráfico de dispersão de pontos Maf vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

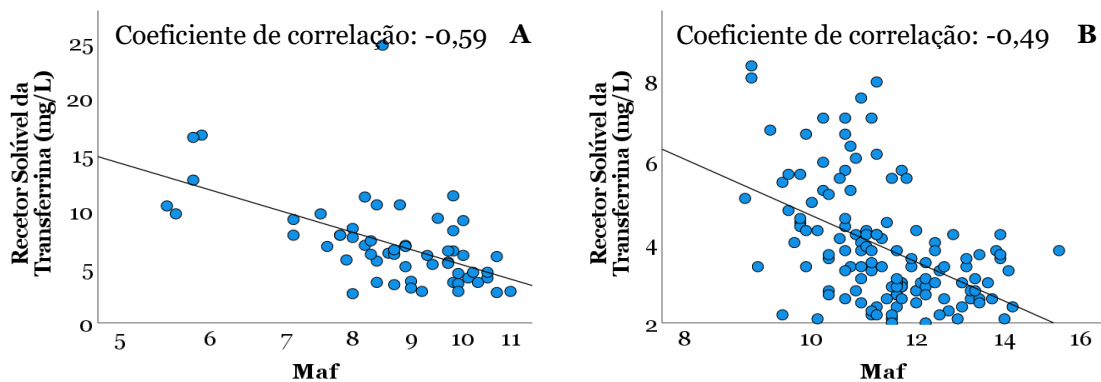


Figura 14- Gráfico de dispersão de pontos Maf vs. Recetor Solúvel da Transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

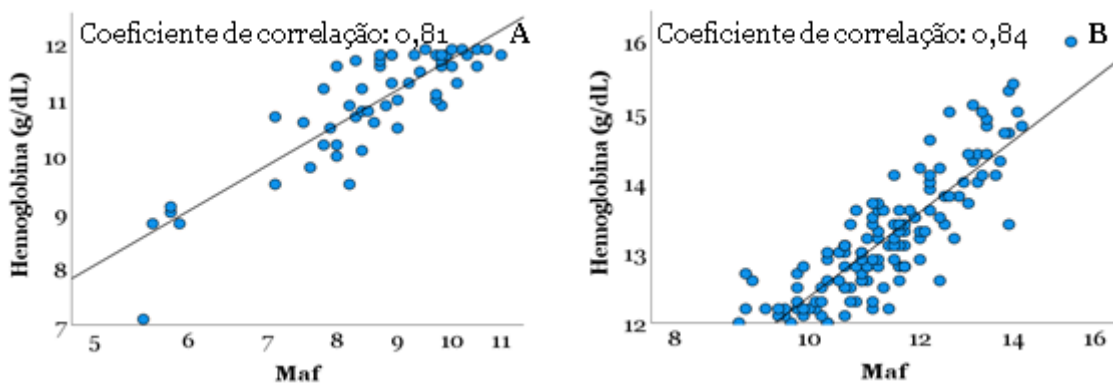


Figura 15- Gráfico de dispersão de pontos Maf vs. Hemoglobina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

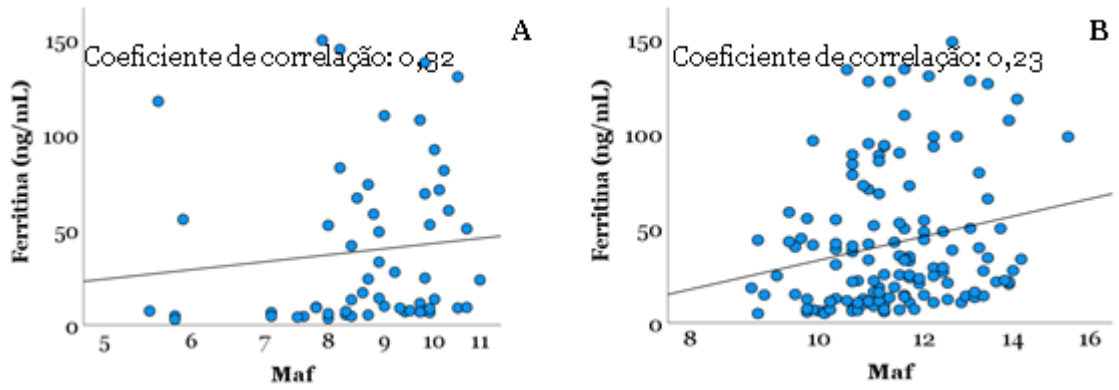


Figura 16- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Ferritina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

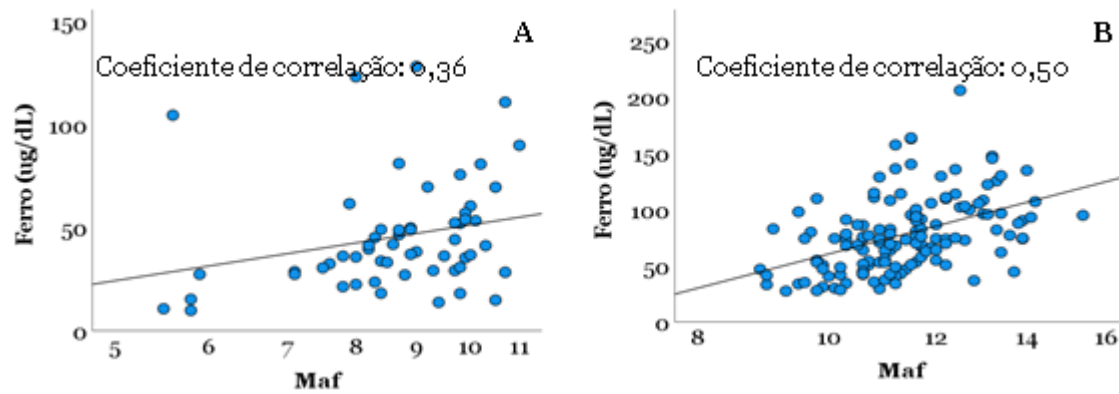


Figura 17- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Ferro. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

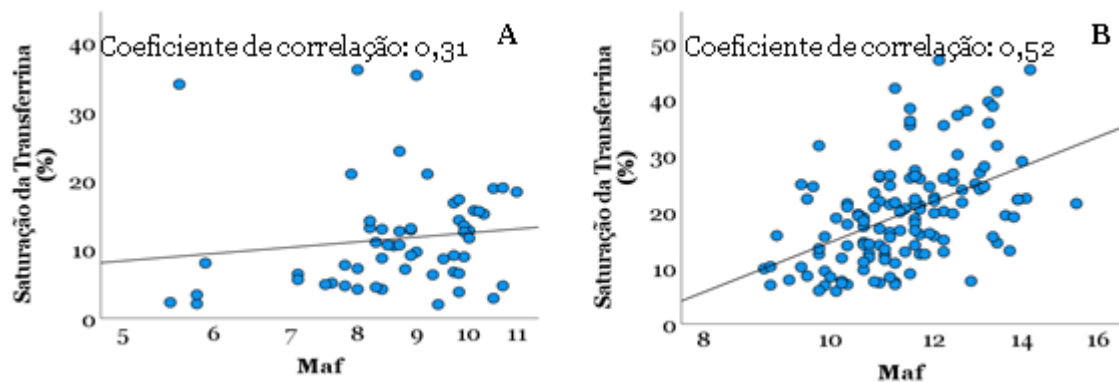


Figura 18- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Saturação da Transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

#### 4.1.1.2. Ferropénia vs. Sem Ferropénia

São 178 pacientes que apresentam deficiência de ferro (valores de ferritina inferiores a 100 ng/mL ou entre 100-300 ng/mL e com a saturação de transferrina inferior a 20%), representando 93,7% dos casos. 54 pacientes (30,3%) estão anémicos e 124 (69,7%) ainda não apresentam um quadro de anemia. Dos 12 (6,3%) pacientes sem ferropénia, apenas 3 (25,0%) são anémicos sendo os restantes 9 (75,0%) não anémicos.

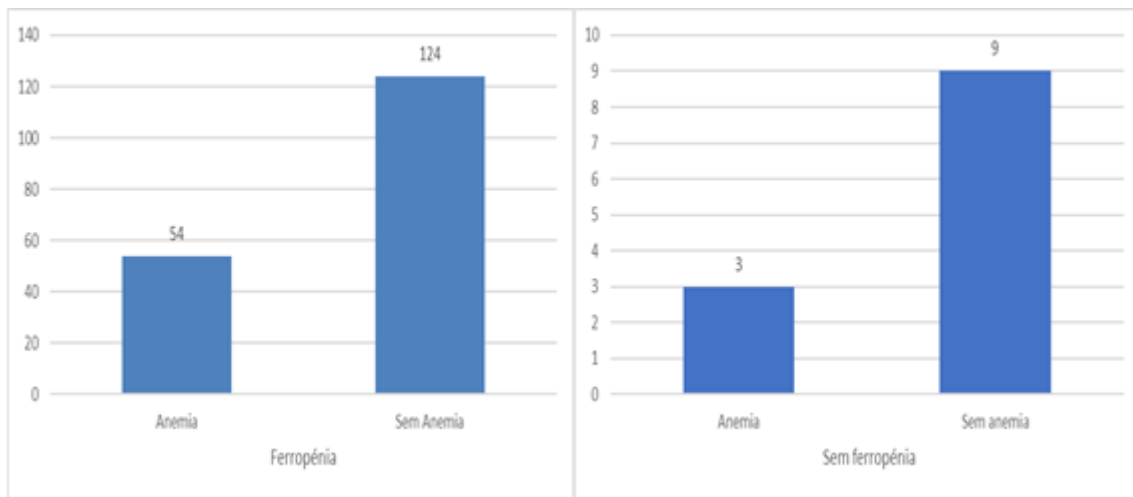


Figura 19- Representação gráfica da caracterização das amostras femininas em função da deficiência de ferro.

Foram estudadas as respectivas medianas e as diferenças entre os grupos em estudo (com e sem anemia) para cada um dos 9 parâmetros analisados. Este estudo encontra-se representado na tabela 5.

Tabela 5- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo (anemia e sem anemia) para pacientes com ou sem ferropénia. *P value* obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney U*. Resultados apresentados em mediana (*percentis* 25-75). \*Significância <0,05.

	Paciente com Ferropénia <i>n</i> = 178			Pacientes sem Ferropénia <i>n</i> = 12		
	Com Anemia <i>n</i> = 54	Sem Anemia <i>n</i> = 124	<i>P value</i>	Com Anemia <i>n</i> = 3	Sem Anemia <i>n</i> = 9	<i>P value</i>
Hemoglobina	11,3 (10,6-11,8)	13,0 (12,5-13,6)	<0,001*	10,5 (9,7-10,8)	13,8 (13,3-14,8)	0,012*
VCM	80,4 (75,3-85,8)	86,4 (81,9-90,4)	<0,001*	74,8 (69,0-78,5)	90,8 (87,2-96,5)	0,013*
Ferritina	13,4 (6,9-56,1)	25,4 (12,9-49,3)	0,041*	117,4 (113,7-133,5)	127,6 (118,2-130,4)	0,926
Ferro	36,9 (28,1-52,1)	73,7 (50,6-95,5)	<0,001*	104,4 (83,0-116,2)	94,4 (82,2-96,5)	0,644
Recetor Solúvel da Transferrina	6,3 (4,3-8,6)	3,6 (2,8-4,5)	<0,001*	5,6 (4,4-7,7)	3,1 (3,0-3,7)	0,094
LHD	7,8 (5,3-13,4)	4,2 (2,7-6,0)	<0,001*	10,7 (9,8-14,3)	3,8 (2,5-4,5)	0,033*
Maf	8,9 (8,2-9,8)	11,2 (10,6-12,2)	<0,001*	7,9 (6,8-8,5)	12,6 (11,6-13,4)	0,012*
Saturação da Transferrina	9,4 (5,5-13,6)	18,5 (12,4-24,3)	<0,001*	33,9 (27,4-34,6)	12,6 (11,6-13,4)	0,644
Transferrina	303,5 (266,0-339,8)	292,6 (253,8-329,9)	0,359	217,9 (213,5-238,1)	239,4 (220,4-270,0)	0,405

#### 4.1.1.2.1. Correlação de *Spearman's*

Na tabela 6 estão representados os parâmetros que obtiveram uma correlação significativa em conjunto com o *P value* e fator de correlação correspondente.

Tabela 6- Resultados da Correlação de *Spearman's* entre os parâmetros LHD e Maf com os restantes nos grupos com e sem ferropénia na presença e ausência de anemia. Apenas os parâmetros com *P value* < 0,05 foram considerados. Resultados apresentados como *P value* (coeficiente de Correlação).

	LHD				Maf			
	Ferropénia n=178		Sem Ferropénia n=12		Ferropénia n=178		Sem ferropénia n=12	
	Com Anemia n=54	Sem Anemia n=124	Com Anemia n=3	Sem Anemia n=9	Com anemia n=54	Sem Anemia n=124	Com Anemia n=3	Sem Anemia n=9
Hemoglobina	0,023 (-0,309)	<0,001 (-0,343)	>0,05	>0,05	<0,001 (0,795)	<0,001 (0,824)	>0,05	<0,001 (0,945)
VCM	<0,001 (-0,668)	<0,001 (-0,460)	>0,05	>0,05	<0,001 (0,837)	<0,001 (0,855)	>0,05	0,021 (0,745)
Ferritina	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,001 (0,432)	>0,05	>0,05	>0,05
Ferro	>0,05	0,002 (-0,269)	>0,05	>0,05	<0,001 (0,463)	<0,001 (0,493)	>0,05	>0,05
Recetor Solúvel da Transferrina	<0,001 (0,585)	<0,001 (0,435)	>0,05	>0,05	<0,001 (-0,593)	<0,001 (-0,506)	>0,05	>0,05
LHD	-	-	-	-	<0,001 (-0,568)	<0,001 (-0,475)	>0,05	>0,05
Maf	<0,001 (-0,568)	<0,001 (-0,475)	>0,05	>0,05	-	-	-	-
Saturação da Transferrina	>0,05	0,002 (-0,282)	>0,05	>0,05	<0,001 (0,430)	<0,001 (0,510)	>0,05	>0,05
Transferrina	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

#### 4.1.1.2.2. Gráficos de Dispersão

##### Com Ferropénia

- LHD

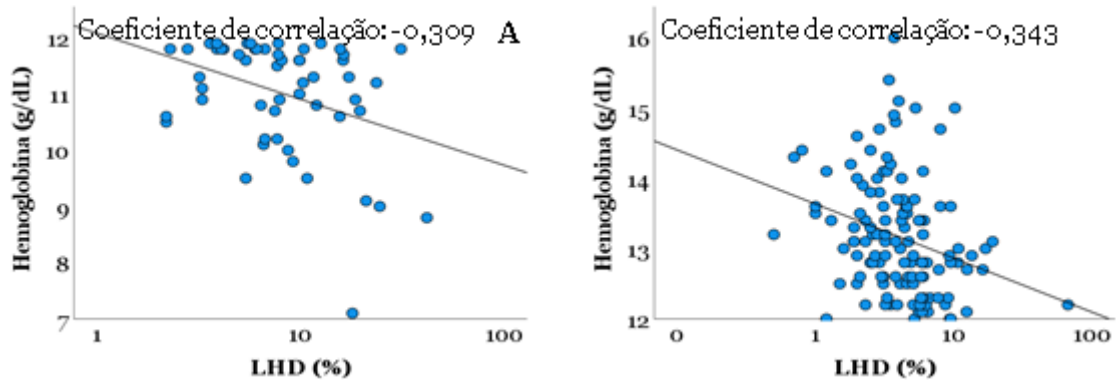


Figura 20- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD vs. Hemoglobina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

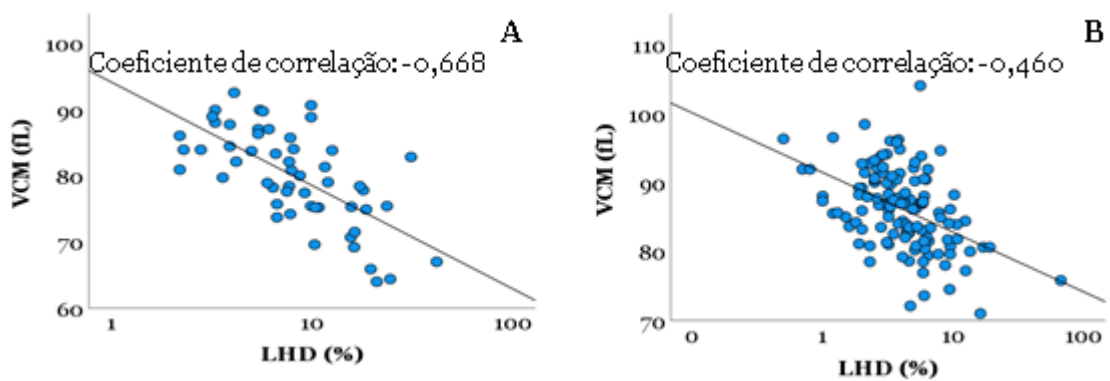


Figura 21- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

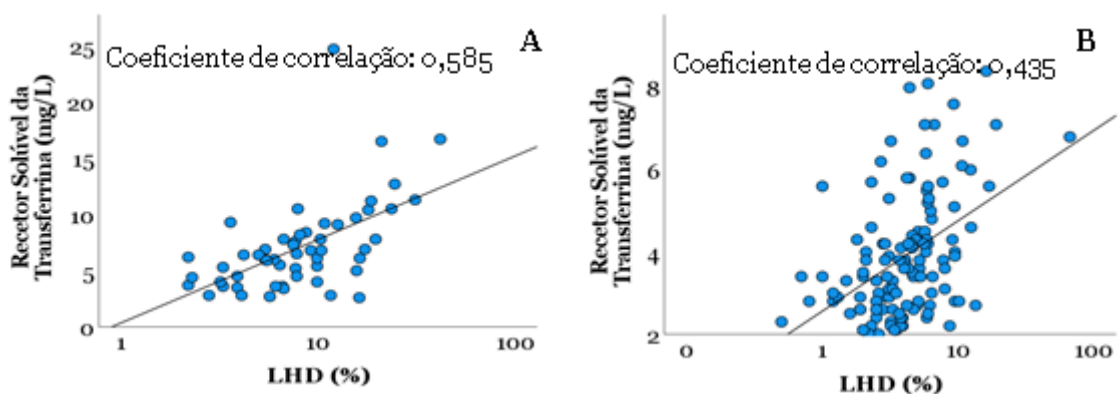


Figura 22- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD vs. Recetor solúvel da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

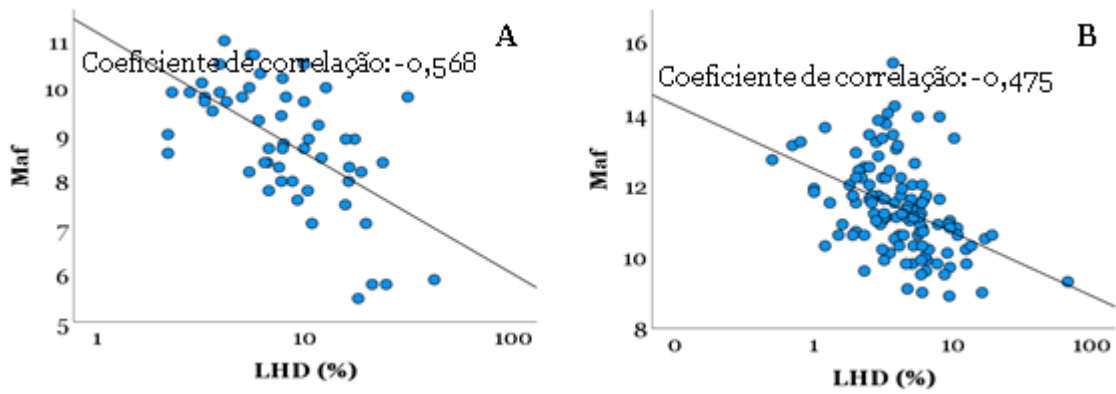


Figura 23- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD vs. Maf. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

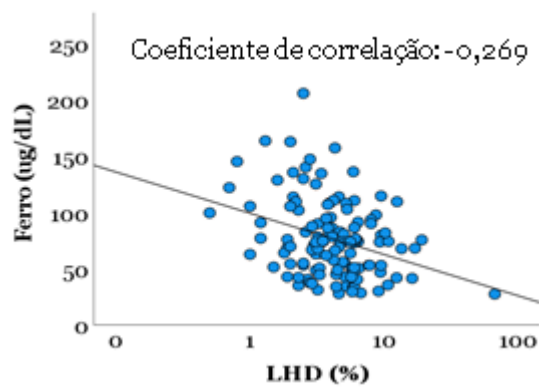


Figura 24- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD vs. Ferro em pacientes sem anemia.

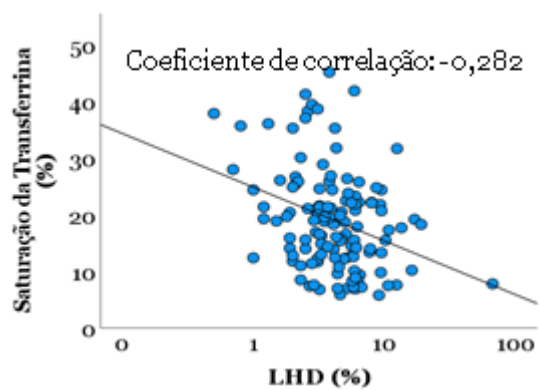


Figura 25- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de LHD vs. Saturação da transferrina em pacientes sem anemia.

- Maf

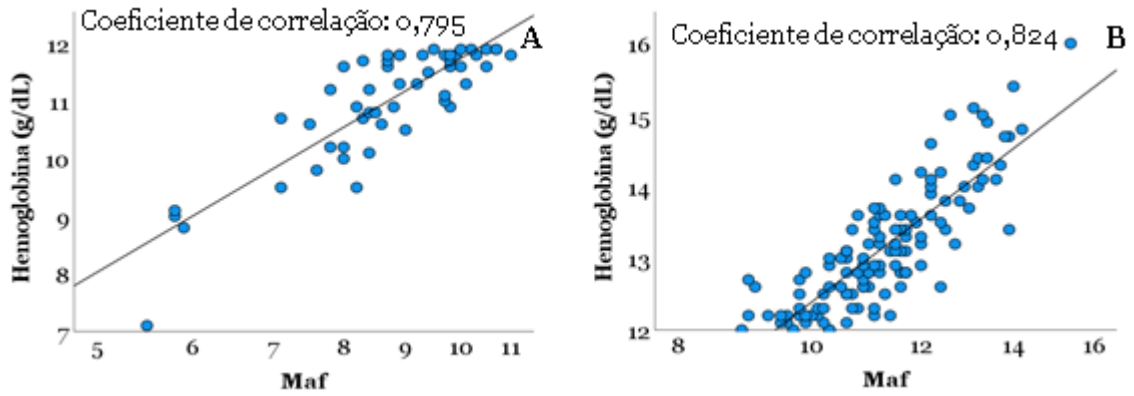


Figura 26- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf *vs.* Hemoglobina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

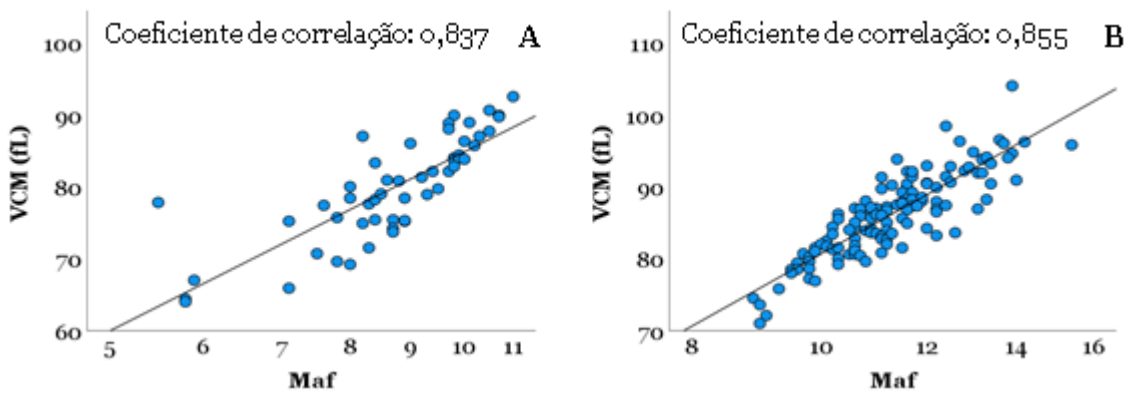


Figura 27- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf *vs.* VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

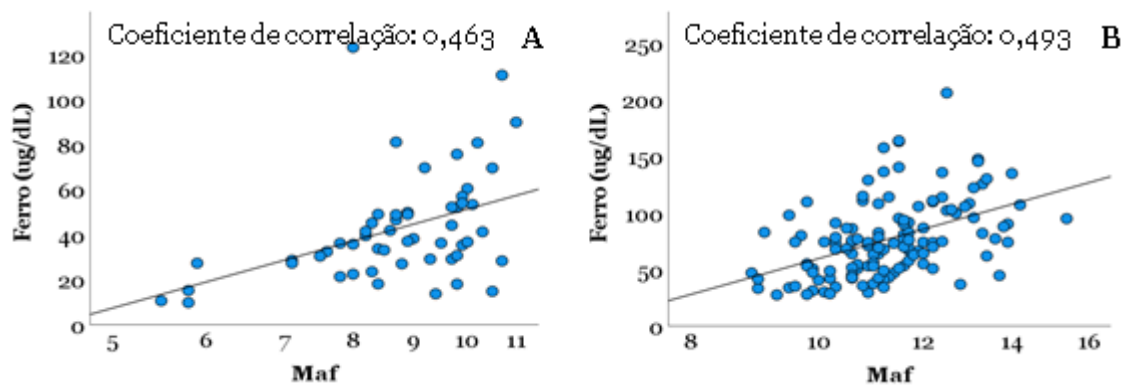


Figura 28- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf *vs.* Ferro. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

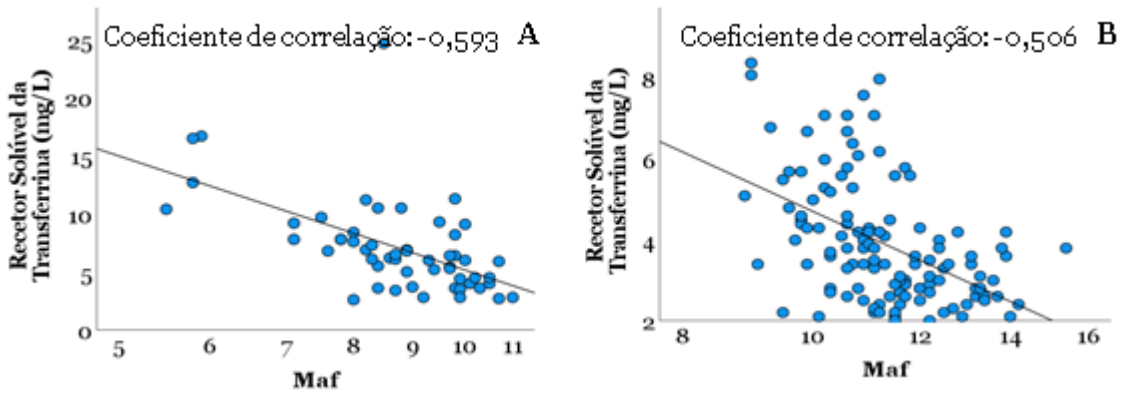


Figura 29- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf *vs.* Recetor solúvel da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

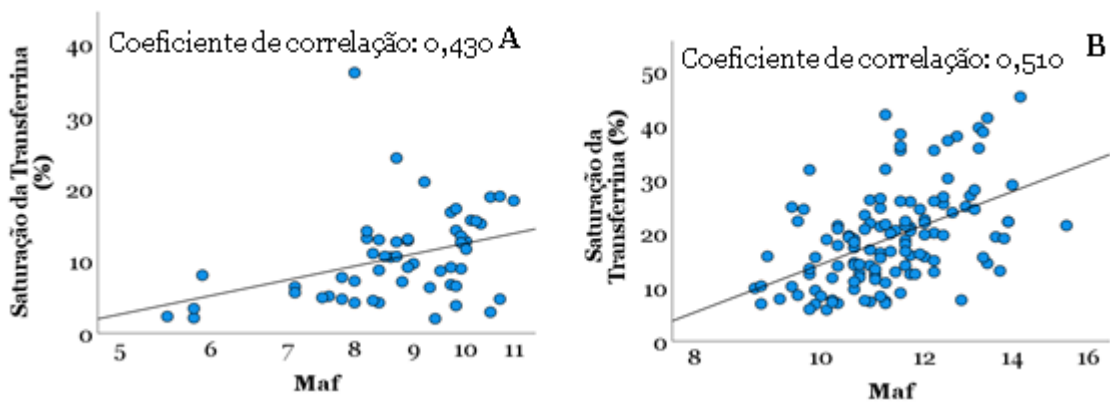


Figura 30- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf *vs.* Saturação da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem Anemia.

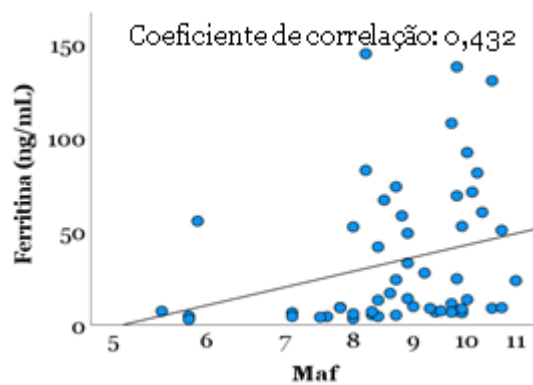


Figura 31- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes com ferropénia de Maf *vs.* Ferritina em pacientes com anemia.

## Sem Ferropénia

- Maf

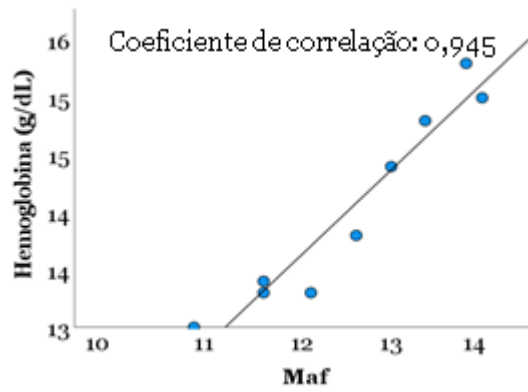


Figura 32- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes sem ferropénia de Maf vs. Hemoglobina em pacientes sem anemia.

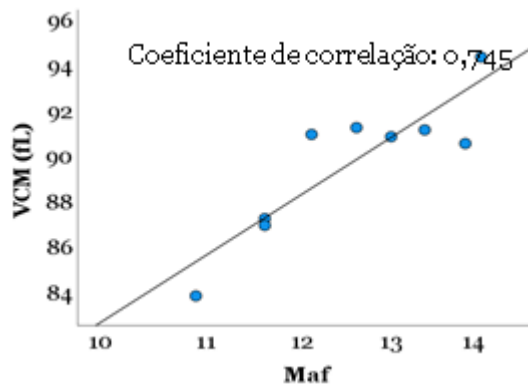


Figura 33- Gráfico de dispersão de pontos em pacientes sem ferropénia de Maf vs. VCM em pacientes sem anemia.

## 4.1.2. Sexo Masculino

### 4.1.2.1. Anemia vs. Sem Anemia

Dos doentes adultos incluídos, 177 amostras são do sexo masculino. 47 (26,6%) correspondem a pacientes com anemia e 130 (73,5%) a pacientes sem anemia (Figura 34).

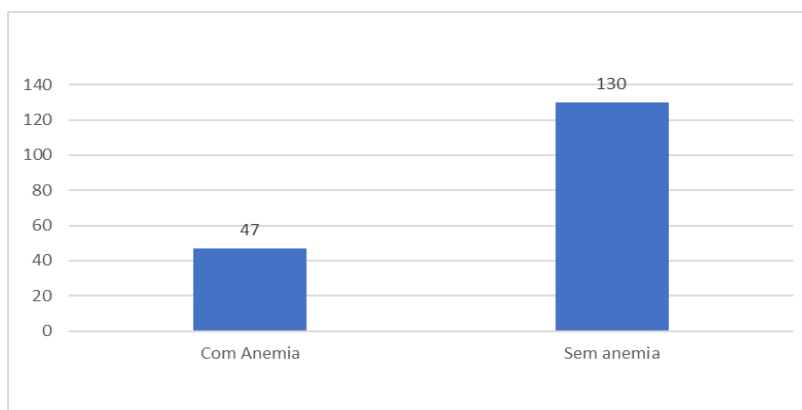


Figura 34- Caracterização da amostra em estudo pela presença ou ausência de anemia.

Para cada um dos nove parâmetros analisados (Hemoglobina, VCM, ferritina, ferro, recetor solúvel da transferrina, LHD, Maf, saturação da transferrina e transferrina) foram determinadas as respetivas medianas e as diferenças entre os grupos em estudo, representadas na tabela 7.

Tabela 7- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo (anemia e sem anemia). *P value* obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney U*. Resultados apresentados em mediana (percentis 25-75). \**P value* <0,05.

	Pacientes com Anemia (n = 47)	Pacientes sem Anemia (n = 130)	<i>P value</i>
Hemoglobina	11,5 (10,2-12,2)	15,4 (14,2-16,7)	<0,001*
VCM	87,5 (78,6-94,6)	92,3 (88,6-95,6)	<0,001*
Ferritina	50,9 (14,7-190,6)	171,6 (86,9-245,7)	<0,001*
Ferro	51,5 (35,6-68,4)	110,4 (83,8-138,9)	<0,001*
Recetor Solúvel da Transferrina	5,1 (3,8-8,1)	2,8 (2,4-6,6)	<0,001*
LHD	5,9 (2,4-12,0)	2,5 (1,5-2,5)	<0,001*
Maf	9,7 (8,2-10,9)	14,3 (13,0-15,5)	<0,001*
Saturação da Transferrina	15,2 (8,6-21,2)	31,8 (23,3-42,2)	<0,001*
Transferrina	254,4 (237,3-303,7)	252,1 (227,6-279,2)	0,286

É possível observar que pacientes com anemia têm valores de hemoglobina, VCM, ferritina, ferro, Maf e saturação de transferrina mais baixos que os pacientes sem anemia. Para os parâmetros de LHD e recetor solúvel da transferrina observa-se o oposto, ou seja, doentes com anemia tem valores mais elevados.

#### 4.1.2.1.1. Correlação de *Spearman's*

Realizou-se também para o grupo masculino uma análise da relação existente entre os diferentes parâmetros, através da Correlação de *Spearman's*. É possível observar os valores desta correlação na tabela 8, estando os parâmetros que obtiveram uma correlação significativa representados com *P value* <0,05 em conjunto com os coeficientes de correlação.

Tabela 8- Resultados da correlação de *Spearman's* entre os parâmetros LHD e Maf com os restantes nos grupos com e sem anemia. Apenas os parâmetros com *P value* < 0,05 foram considerados. Resultados apresentados como *P value* (coeficiente de Correlação).

	LHD		Maf	
	Com Anemia	Sem Anemia	Com Anemia	Sem Anemia
Hemoglobina	>0,05	0,001 (-0,30)	<0,001 (0,78)	<0,001 (0,86)
VCM	<0,001 (-0,71)	0,03 (-0,19)	<0,001 (0,62)	<0,001 (0,56)
Ferritina	0,02 (-0,35)	<0,001 (-0,37)	0,03 (0,32)	0,005 (0,24)
Ferro	<0,001 (-0,48)	<0,001 (-0,44)	<0,001 (0,56)	<0,001 (0,53)
Recetor Solúvel da Transferrina	<0,001 (0,69)	<0,001 (0,35)	<0,001 (-0,57)	0,05 (-0,17)
LHD	-	-	0,001 (-0,48)	<0,001 (-0,33)
Maf	0,001 (-0,48)	<0,001 (-0,33)	-	-
Saturação da Transferrina	<0,001 (-0,52)	<0,001 (-0,48)	<0,001 (0,53)	<0,001 (0,52)
Transferrina	0,01 (0,39)	>0,05	>0,05	0,009 (-0,23)

#### 4.1.2.1.2. Gráficos de Dispersão

Foram realizados os gráficos de dispersão de pontos da relação entre os parâmetros correlacionados no ponto anterior.

- LHD

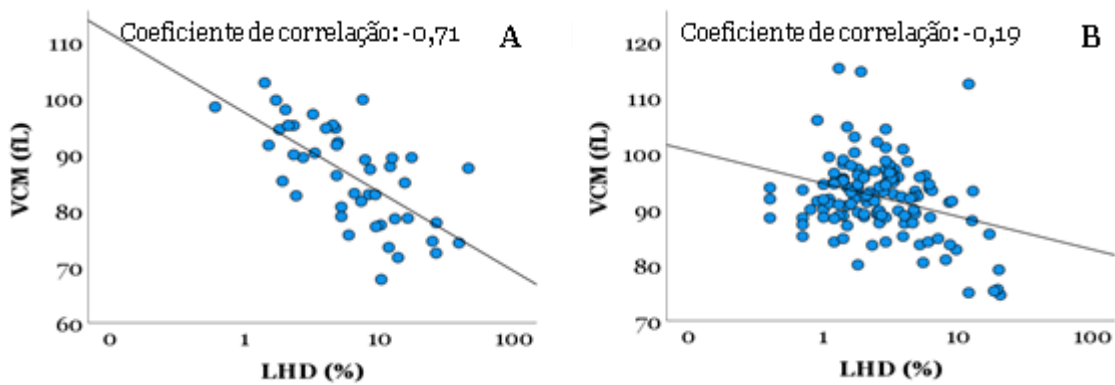


Figura 35- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

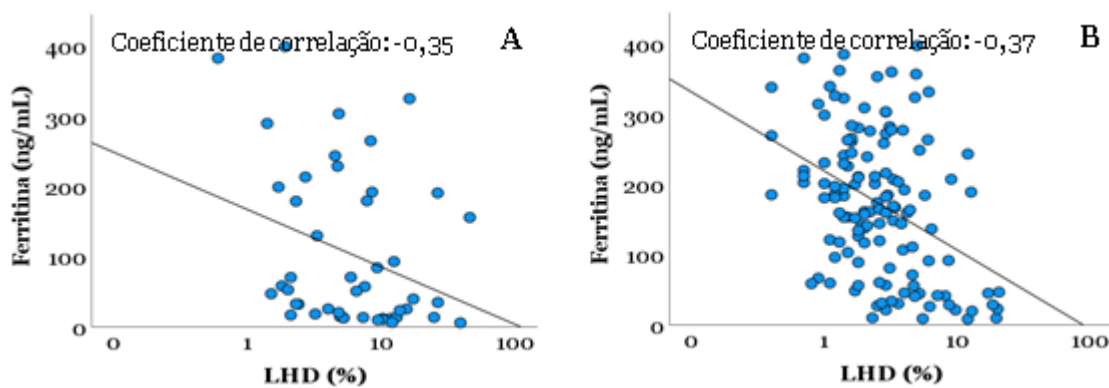


Figura 36- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Ferritina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

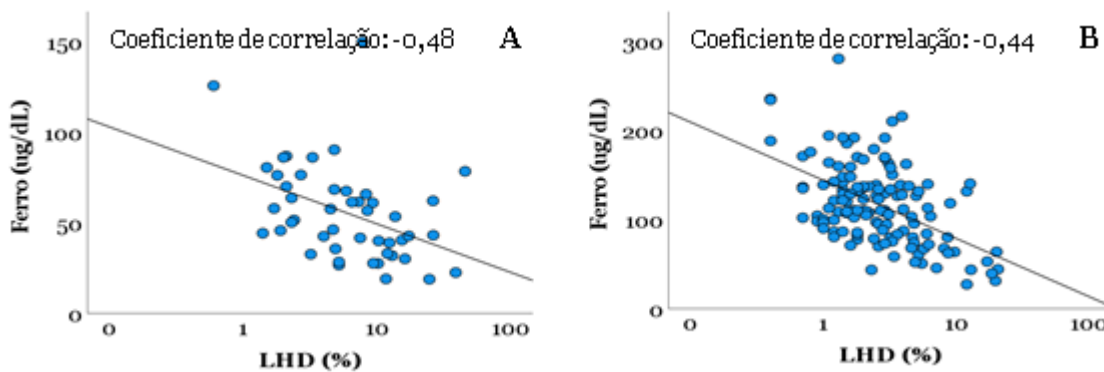


Figura 37- Gráfico de dispersão de pontos LHD vs. Ferro. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

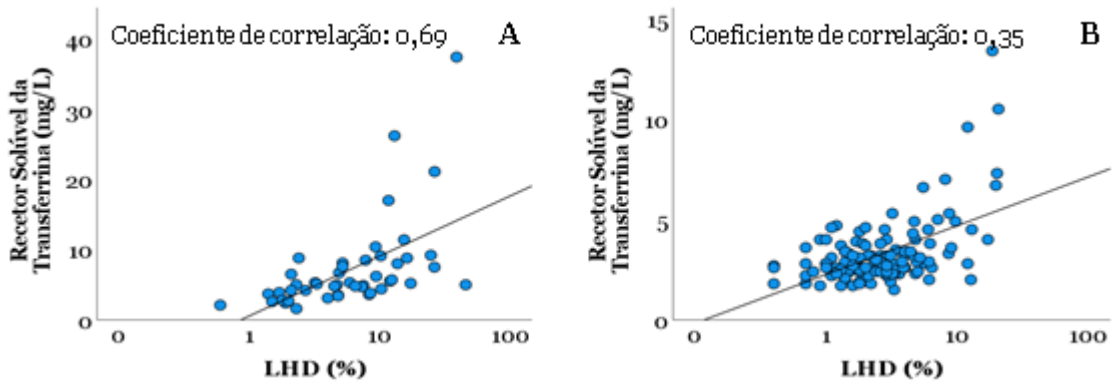


Figura 38- Gráfico de dispersão de pontos LHD vs. Recetor Solúvel da Transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

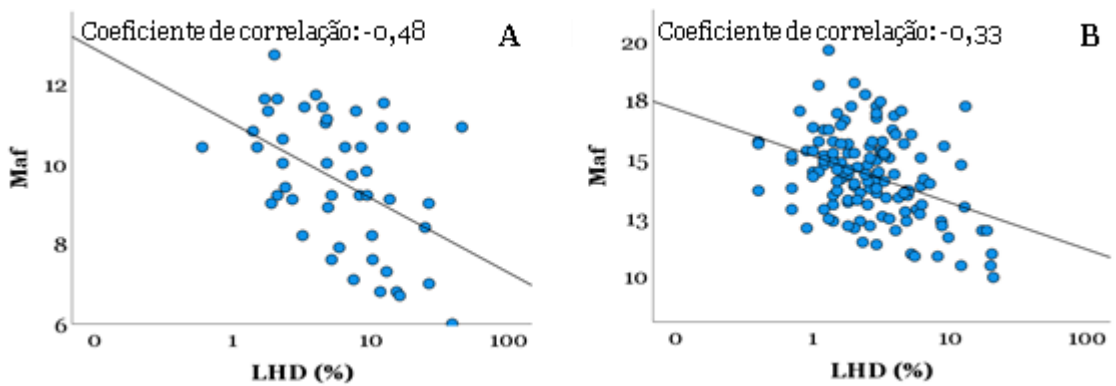


Figura 39- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Maf. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

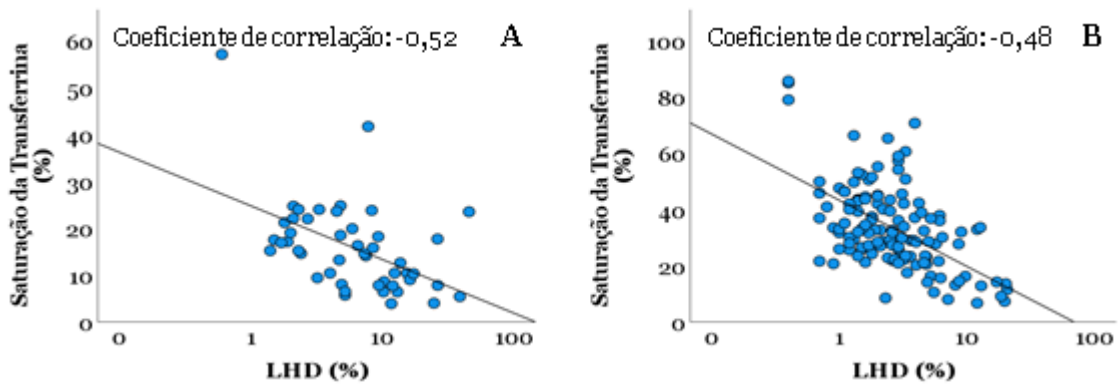


Figura 40- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Saturação da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

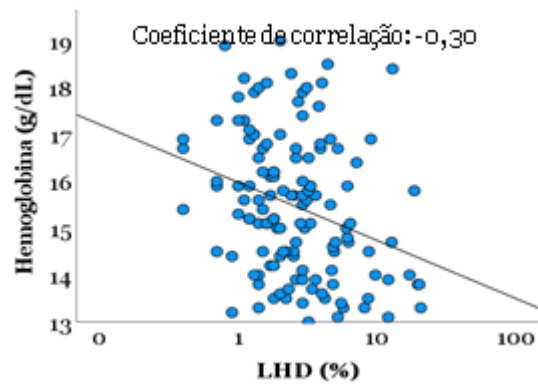


Figura 41- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Hemoglobina em pacientes sem anemia.

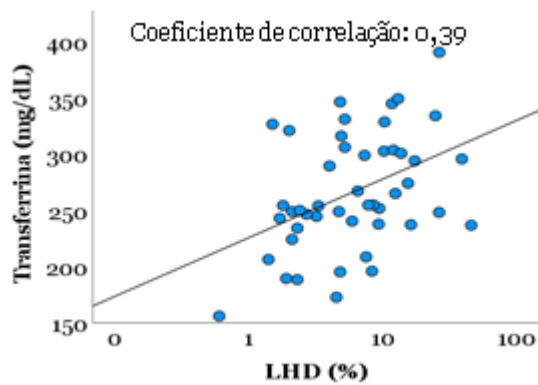


Figura 42- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Transferrina em pacientes com anemia.

- Maf

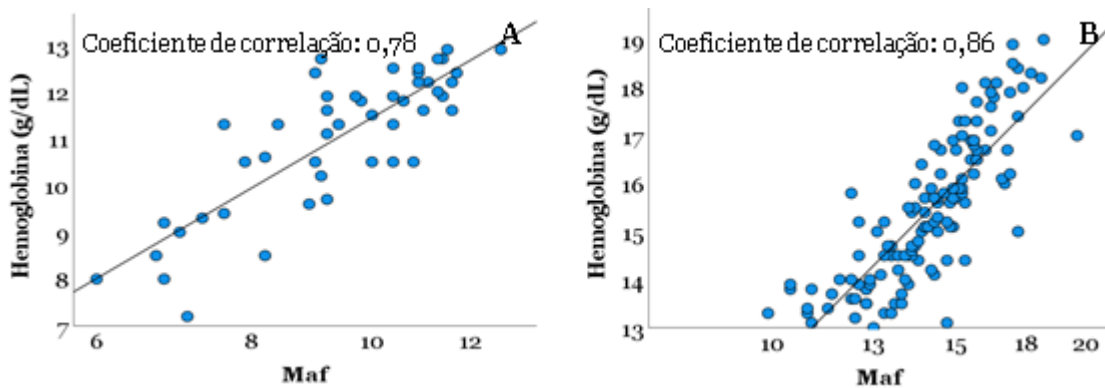


Figura 43- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Hemoglobina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

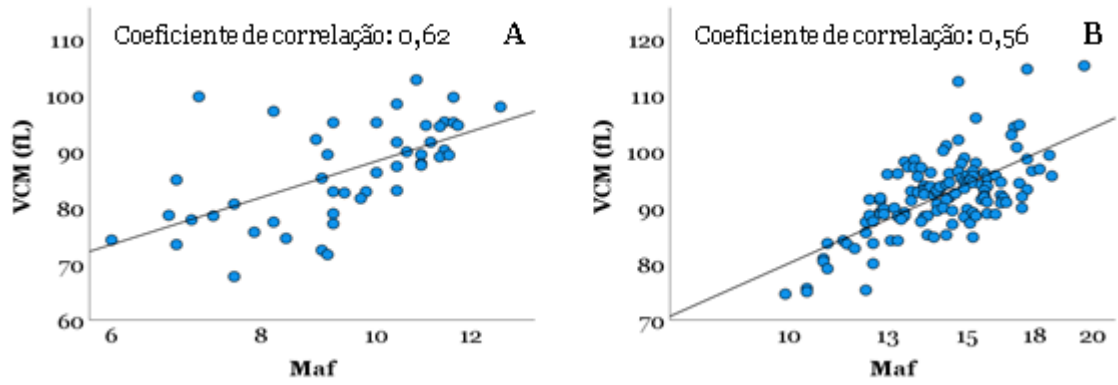


Figura 44- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

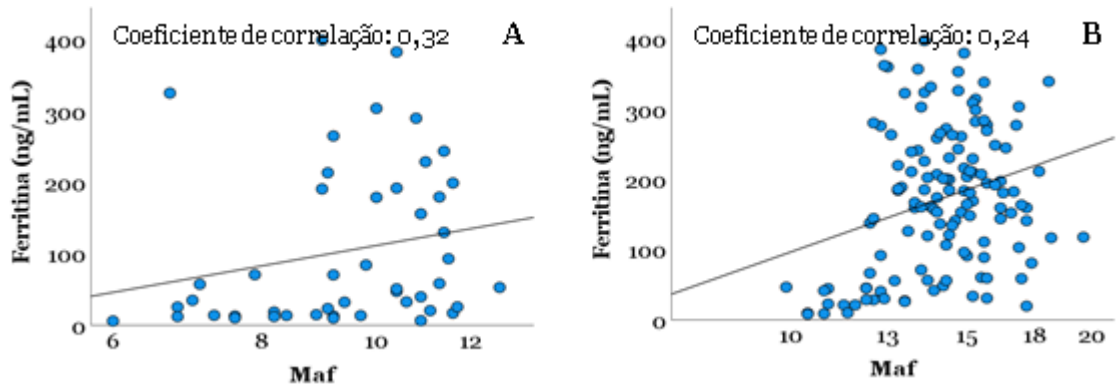


Figura 45- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

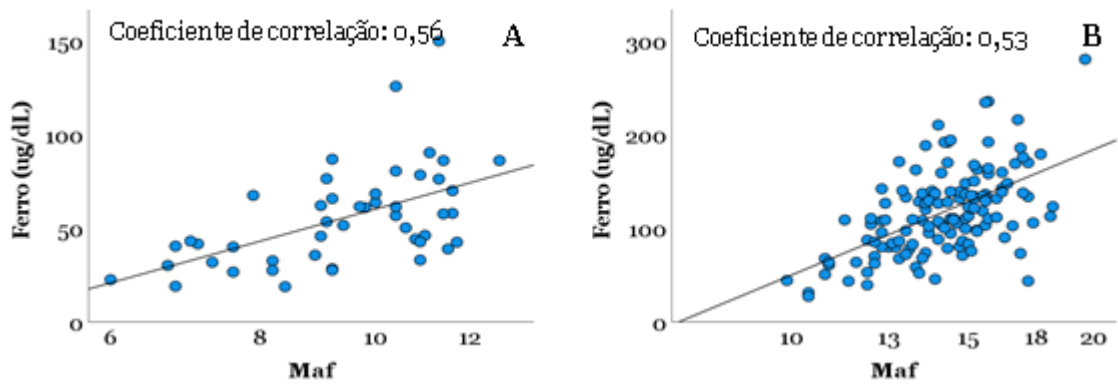


Figura 46- Gráfico de dispersão de pontos Maf vs. Maf. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

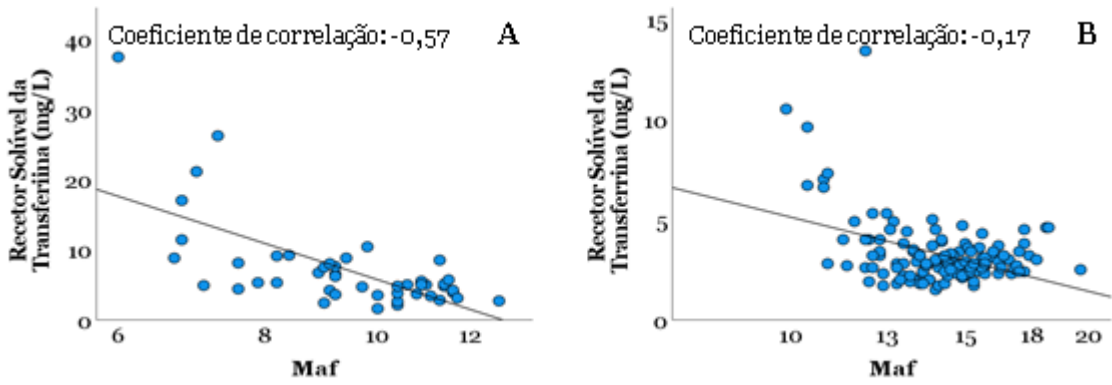


Figura 47- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Recetor Solúvel da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

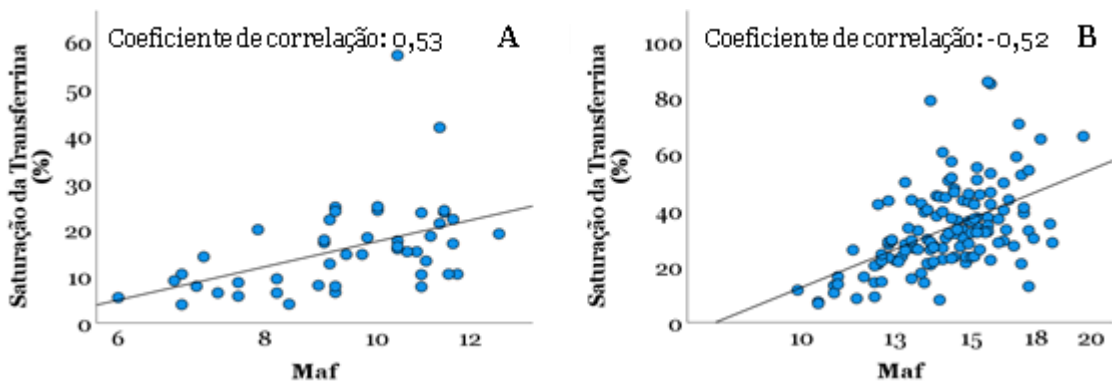


Figura 48- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Saturação da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia

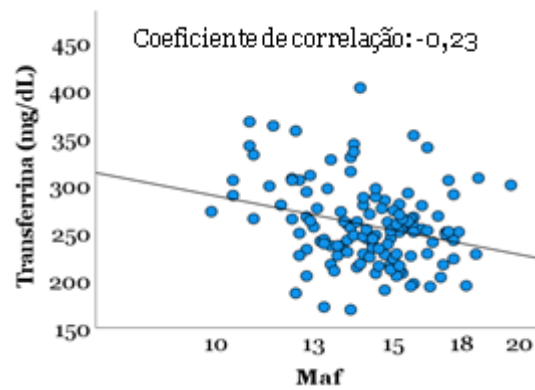


Figura 49- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Transferrina em paciente sem anemia.

#### 4.1.2.2. Ferropénia vs. Sem Ferropénia

São 73 pacientes que apresentam deficiência de ferro (valores de ferritina inferiores a 100 ng/mL ou entre 100-300 ng/mL e com a saturação de transferrina inferior a 20%), representando 41,2% dos casos. 36 (49,3%) estão anémicos e 37 (50,7%) ainda não apresentam um quadro de anemia. Dos 104 (58,8%) pacientes sem ferropénia, apenas 11 (10,6%) são anémicos sendo os restantes 93 (89,4%) não anémicos.

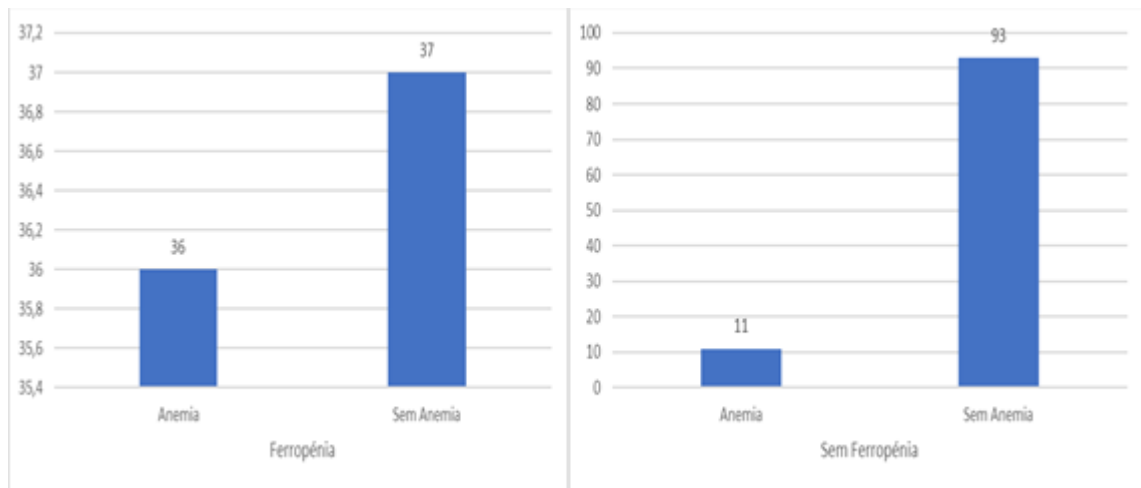


Figura 50- Representação gráfica da caracterização das amostras femininas em função da deficiência de ferro.

Foram estudadas as medianas e as diferenças entre os grupos estudados (com e sem anemia) para cada um dos 9 parâmetros analisados. Este estudo encontra-se representado na tabela 9.

Tabela 9- Caracterização dos parâmetros hematológicos para estudo de anemias e suas diferenças nos dois grupos em estudo (anemia e sem anemia) para pacientes com ou sem ferropénia. *P value* obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney U*. Resultados apresentados em mediana (*percentis 25-75*). \*Significância <0,05.

	Paciente com Ferropénia <i>n</i> = 73			Pacientes sem Ferropénia <i>n</i> = 104		
	Com Anemia <i>n</i> = 36	Sem Anemia <i>n</i> = 37	<i>P value</i>	Com Anemia <i>n</i> = 11	Sem Anemia <i>n</i> = 93	<i>P value</i>
Hemoglobina	11,6 (9,6-12,2)	14,2 (13,7-16,1)	<0,001*	11,1 (10,5-12,5)	15,6 (14,6-16,7)	<0,001*
VCM	86,1 (77,5-94,6)	86,1 (77,5-94,6)	0,430	89,0 (85,2-95,1)	93,3 (90,7-96,0)	0,015*
Ferritina	28,9 (13,5-67,4)	44,6 (26,6-59,9)	0,270	243,5 (178,8-324,8)	207,0 (160,2-276,5)	0,315
Ferro	43,7 (32,7-61,5)	80,0 (55,6-119,8)	<0,001*	68,4 (57,6-86,1)	123,1 (99,1-145,1)	<0,001*
Recetor Solúvel da Transferrina	5,4 (4,3-8,6)	3,8 (2,8-5,0)	<0,001*	4,2 (2,4-5,1)	33,6 (27,3-44,1)	0,011*
LHD	6,9 (2,6-12,3)	4,6 (2,6-8,7)	0,126	4,5 (2,3-8,3)	2,0 (1,4-3,2)	0,008*
Maf	9,3 (8,0-10,9)	12,7 (11,5-15,0)	<0,001*	10,0 (9,1-11,3)	14,6 (13,6-15,6)	<0,001*
Saturação da Transferrina	12,9 (7,8-17,4)	21,0 (13,4-29,6)	<0,001*	23,8 (22,0-24,8)	33,6 (27,3-44,1)	0,004*
Transferrina	281,9 (248,5-319,9)	289,1 (250,7-318,4)	0,643	196,0 (188,5-246,6)	245,8 (223,3-264,5)	0,008*

#### 4.1.2.2.1. Correlação de *Spearman's*

Através da Correlação de *Spearman's* observou-se a relação existente entre os novos parâmetros analisados. Na tabela 10 estão representados os parâmetros que obtiveram uma correlação significativa em conjunto com o *P value* e fator de correlação correspondente.

Tabela 10- Resultados da Correlação de *Spearman's* entre os parâmetros LHD e Maf com os restantes nos grupos com e sem ferropénia na presença e ausência de anemia. Apenas os parâmetros com *P value* < 0,05 foram considerados. Resultados apresentados como *P value* (coeficiente de Correlação).

	LHD				Maf			
	Ferropénia		Sem Ferropénia		Ferropénia		Sem ferropénia	
	Com Anemia	Sem Anemia	Com Anemia	Sem Anemia	Com anemia	Sem Anemia	Com Anemia	Sem Anemia
Hemoglobina	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001 (0,774)	<0,001 (0,858)	0,001 (0,852)	<0,001 (0,823)
VCM	<0,001 (-0,729)	<0,001 (-0,601)	>0,05	>0,05	<0,001 (0,601)	<0,001 (0,802)	0,029 (0,653)	<0,001 (0,374)
Ferritina	0,031 (-0,360)	0,005 (-0,457)	>0,05	>0,05	0,008 (0,436)	0,001 (0,526)	>0,05	>0,05
Ferro	0,002 (-0,507)	<0,001 (-0,760)	>0,05	>0,05	0,001 (0,540)	<0,001 (0,653)	>0,05	<0,001 (0,354)
Recetor Solúvel da Transferrina	<0,001 (0,683)	<0,001 (0,670)	0,016 (0,700)	>0,05	<0,001 (-0,726)	<0,001 (-0,543)	>0,05	>0,05
LHD	-	-	-	-	<0,001 (-0,567)	<0,001 (-0,572)	>0,05	>0,05
Maf	<0,001 (-0,567)	<0,001 (-0,572)	>0,05	>0,05	-	-	-	-
Saturação da Transferrina	<0,001 (-0,582)	<0,001 (-0,725)	>0,05	0,022 (-0,237)	<0,001 (0,559)	<0,001 (0,693)	>0,05	0,002 (0,317)
Transferrina	0,022 (0,381)	>0,05	>0,05	0,013 (0,256)	>0,05	0,034 (-0,350)	>0,05	>0,05

#### 4.1.2.2.2. Gráficos de Dispersão

##### Com Ferropénia

- LHD

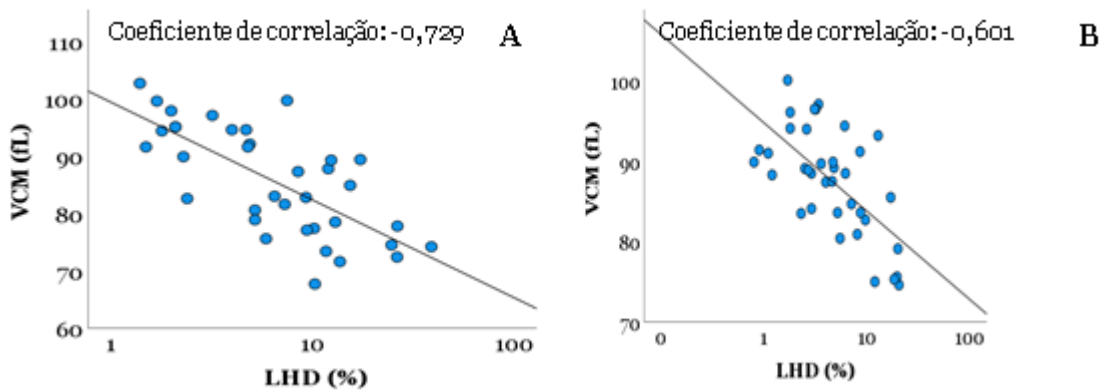


Figura 51- Gráfico de dispersão de pontos LHD vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

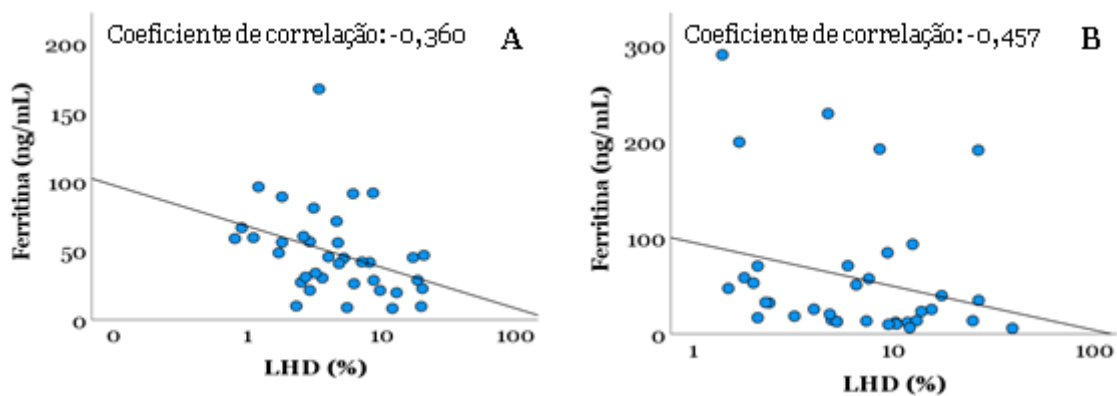


Figura 52- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Ferritina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

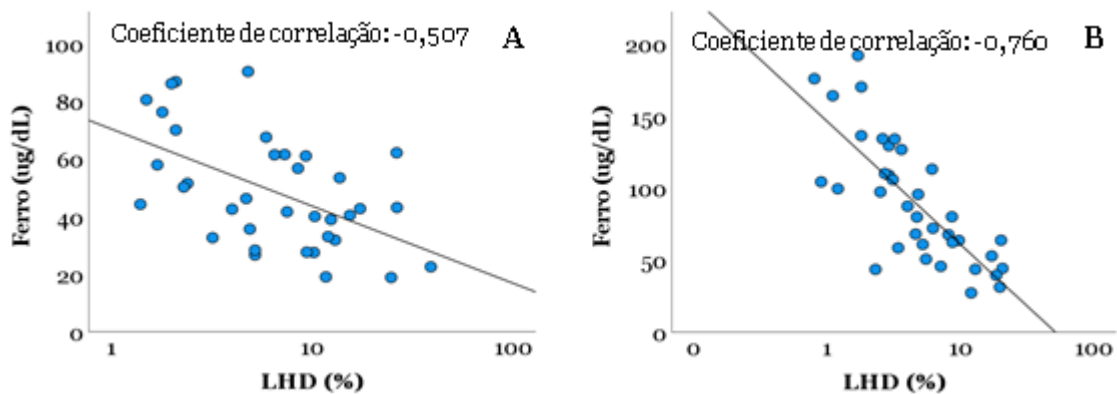


Figura 53- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Ferro. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

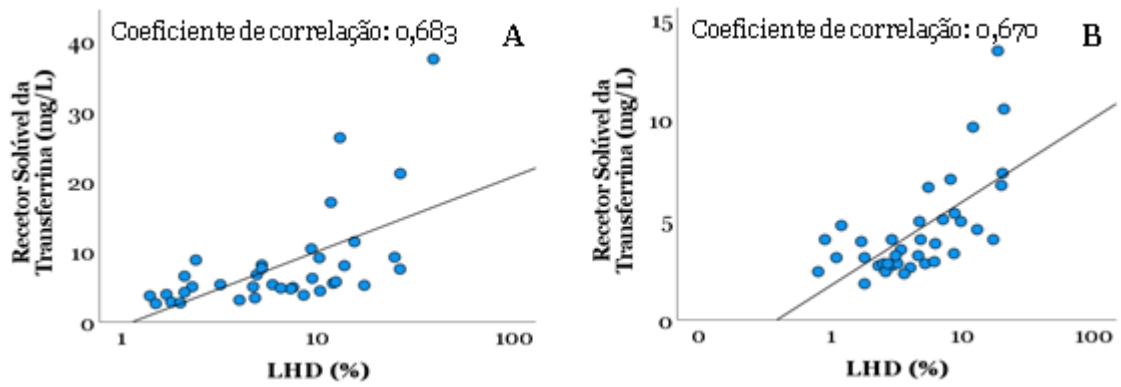


Figura 54- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Recetor solúvel da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

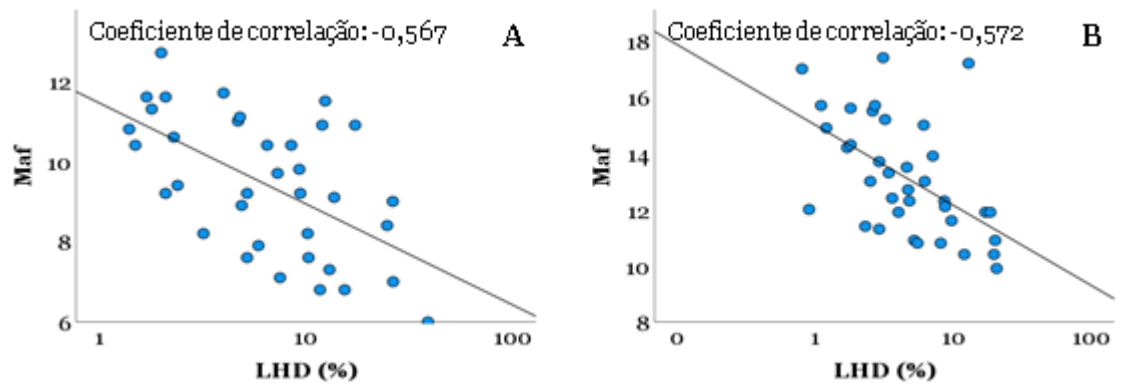


Figura 55- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Maf. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

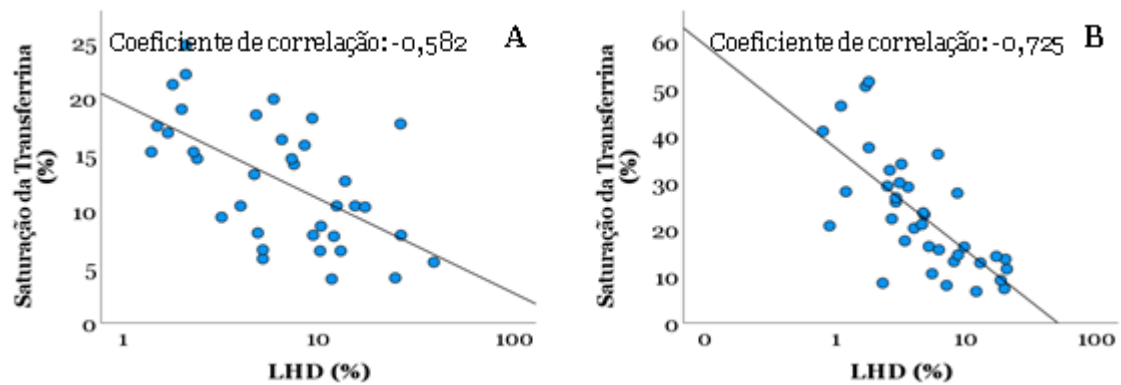


Figura 56- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Saturação da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

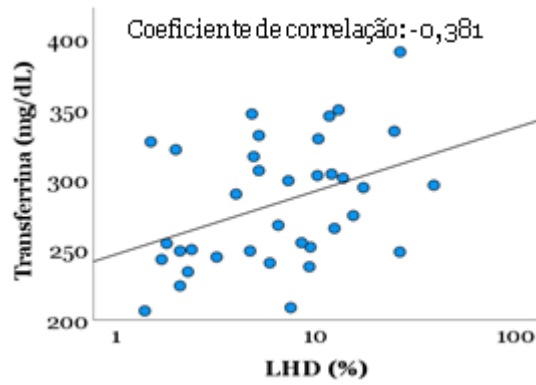


Figura 57- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Transferrina em pacientes com anemia.

- Maf

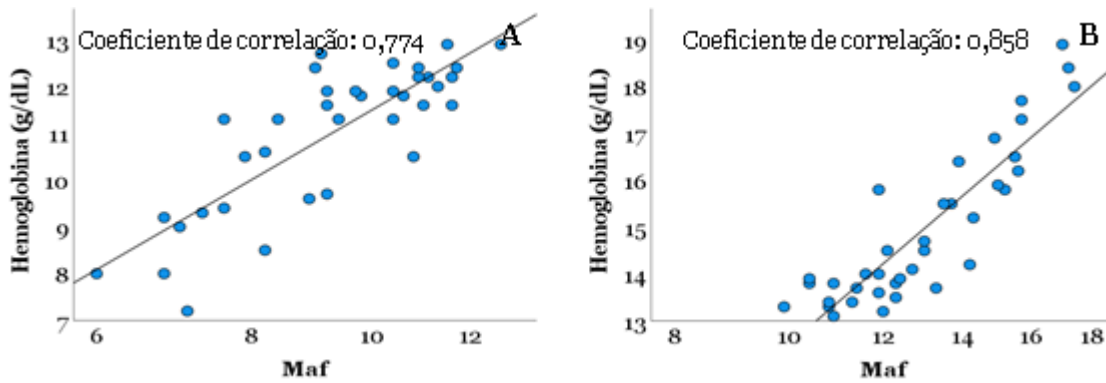


Figura 58- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Hemoglobina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

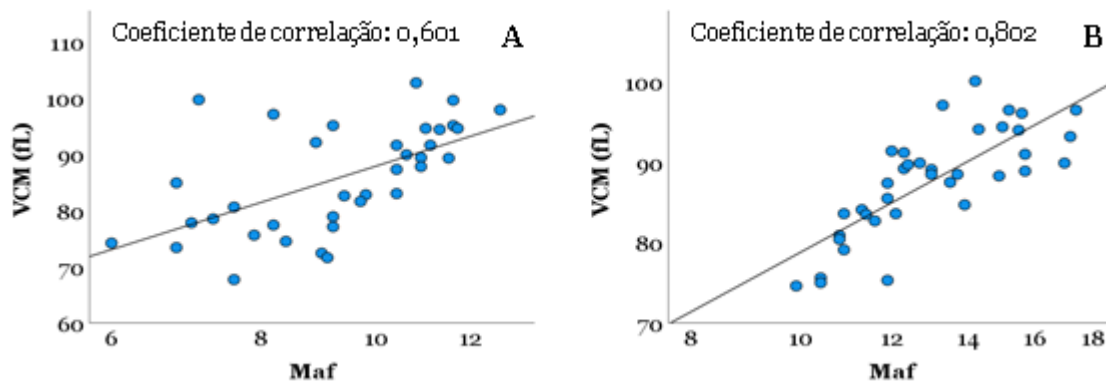


Figura 59- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

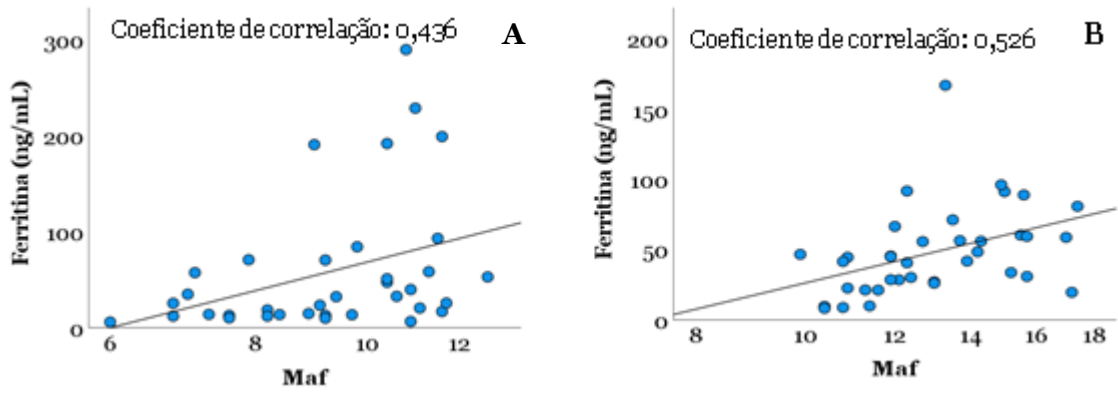


Figura 60- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Ferritina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

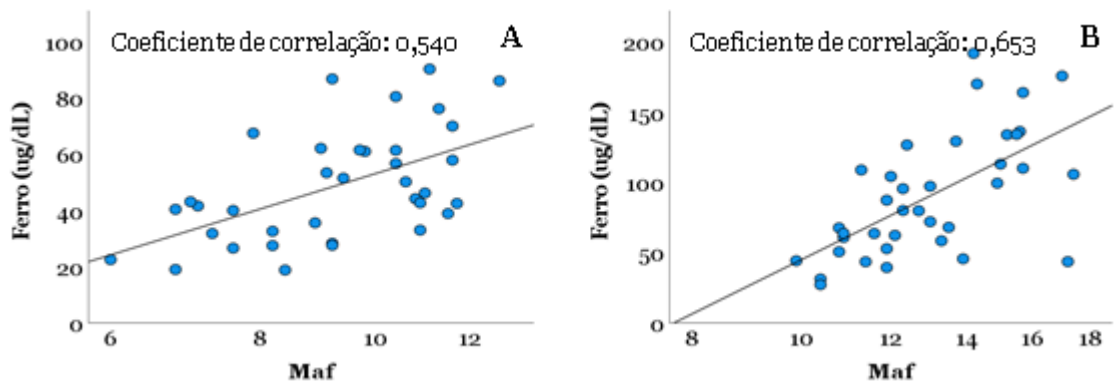


Figura 61- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Ferro. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

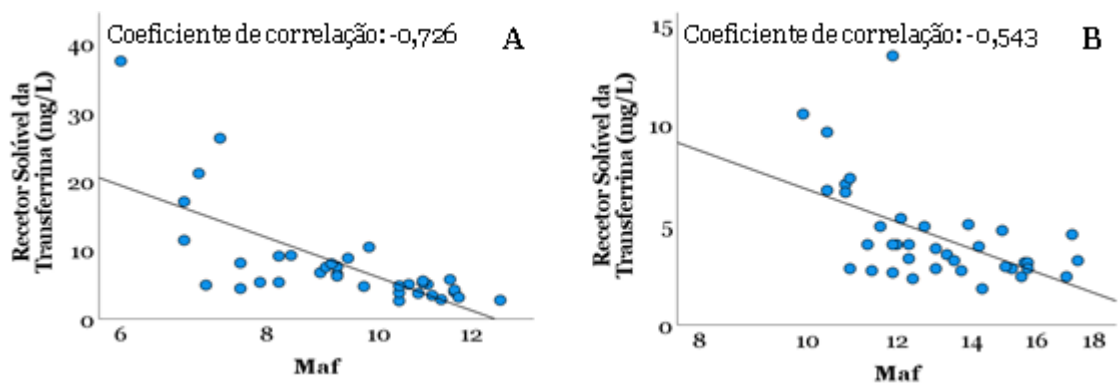


Figura 62- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Recetor solúvel da transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

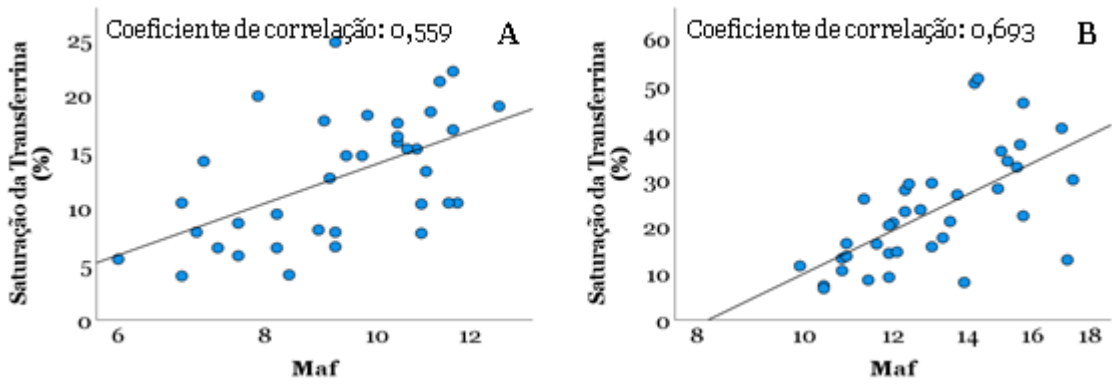


Figura 63- Representação gráfica da correlação de *Spearman's* de Maf vs. Saturação transferrina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

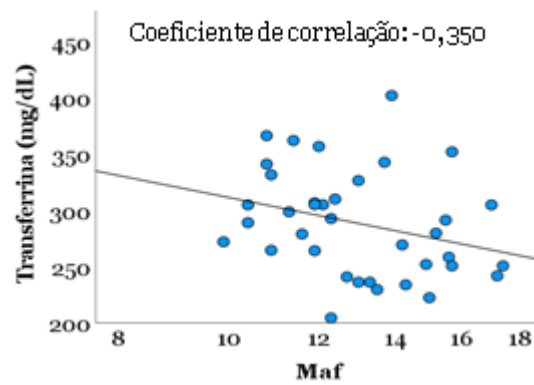


Figura 64- Representação gráfica da correlação de *Spearman's* de Maf vs. Transferrina em pacientes sem anemia.

### Sem Ferropénia

- LHD

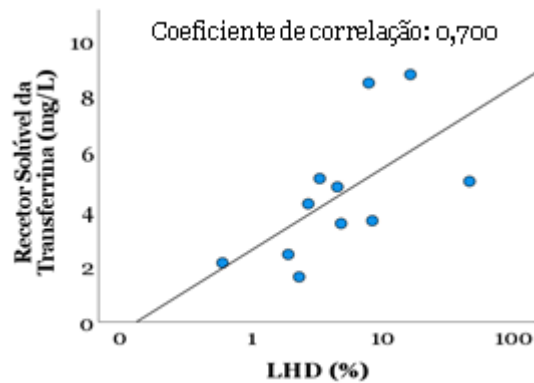


Figura 65- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Recetor solúvel da transferrina em pacientes com anemia.

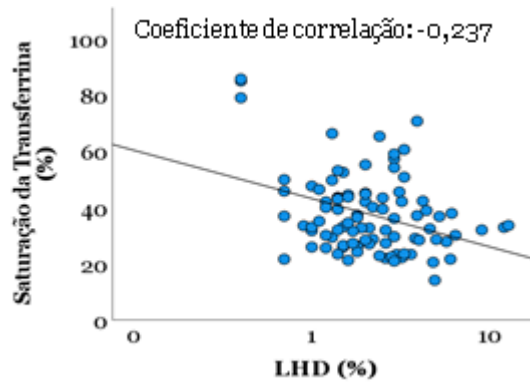


Figura 66- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Saturação da transferrina em pacientes sem anemia.

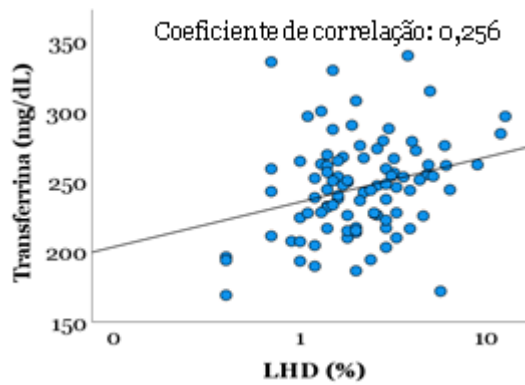


Figura 67- Gráfico de dispersão de pontos de LHD vs. Transferrina em pacientes sem anemia.

- Maf

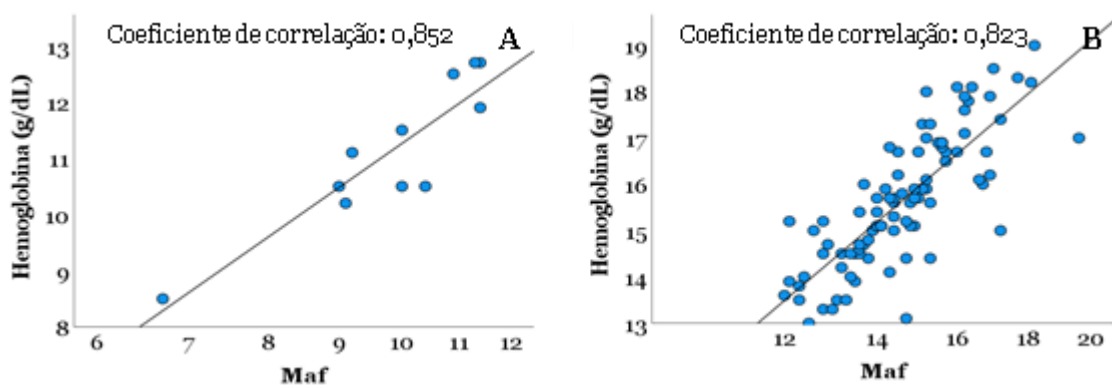


Figura 68- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Hemoglobina. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

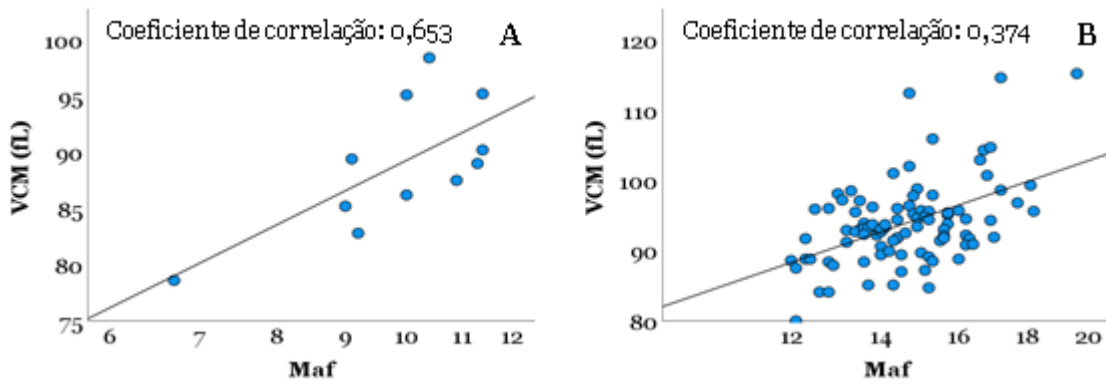


Figura 69- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. VCM. (A) Pacientes com Anemia. (B) Pacientes sem anemia.

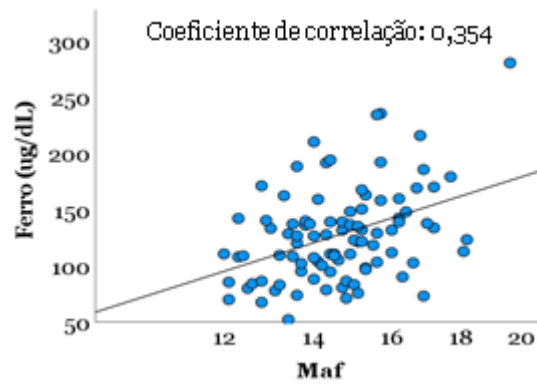


Figura 70- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Ferro em pacientes sem anemia.

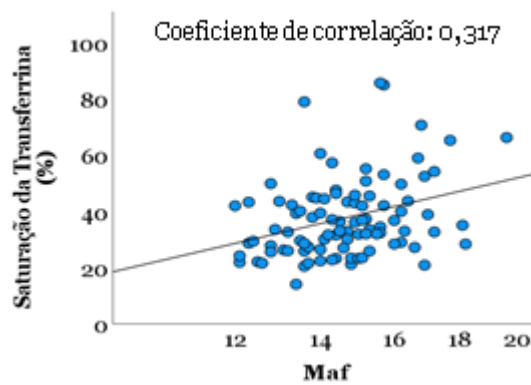


Figura 71- Gráfico de dispersão de pontos de Maf vs. Saturação da transferrina em pacientes sem anemia.

## 4.2. Especificidade e Sensibilidade

Foram realizados testes para definir a sensibilidade e especificidade do LHD e Maf. A sensibilidade avalia a capacidade de estes parâmetros detetarem a ferropénia enquanto a especificidade avalia a capacidade de estes parâmetros não detetarem a ferropénia não estando a doença presente.

A sensibilidade foi calculada através do número dos resultados verdadeiros positivos e dos falsos negativos e a especificidade foi determinada através de verdadeiros negativos e falsos positivos. Os resultados encontram-se na tabela 11.

Tabela 11- Valores de sensibilidade e especificidade calculados para os parâmetros LHD e Maf.

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
LHD	34,2	73,2
Maf	79,7	56,9

## 5. Discussão de Resultados

O diagnóstico de anemia e de deficiência férrica bem como o seu controlo terapêutico tem implicações na vida quotidiana, refletindo-se numa grande quantidade de pacientes seguidos e avaliados nas consultas de Imunohemoterapia nos anos 2018 e 2019.

Após seleção dos pacientes, estes foram divididos em função do sexo, feminino *versus* masculino, existindo depois uma divisão em função da presença ou ausência de anemia e pela presença ou ausência de ferropénia.

Para a execução dos resultados foram usados dois testes estatísticos principais, o teste de *Mann-Whitney U* para avaliar as diferenças entre grupo com e sem anemia, e o teste da correlação de *Spearman's* para avaliar a associação entre duas variáveis<sup>17</sup>. O segundo teste permitiu a determinação do fator de correlação, ou *r*, que é considerado uma medida de potência de uma relação linear entre duas variáveis, podendo assumir qualquer valor entre -1 e +1<sup>18</sup>. Valores entre 0 e 0,3 (negativos ou positivos) significam uma relação linear muito fraca<sup>18</sup>, entre 0,3 e 0,7 uma relação linear moderada e valores entre 0,7 e 1,0 indicam uma relação linear muito forte<sup>18</sup>.

A faixa etária com mais pedidos foi entre os 35 anos e os 65 anos, verificando-se esta prevalência em ambos os sexos (figura 5). Relativamente à prevalência da anemia nos dois sexos é possível constatar que mais de metade dos pacientes que foram diagnosticados com anemia são mulheres, o que sustenta os estudos já conduzidos sobre esta temática, que afirmam que o sexo feminino é um fator de risco, principalmente em mulheres em idade fértil ou grávidas<sup>19</sup>.

No sexo feminino, é possível observar que mais de metade da amostra (70,0%) não tem um diagnóstico de anemia (figura 6).

Na tabela 3 observamos as diferenças entre os grupos anemia *versus* sem anemia. O LHD está aumentado no grupo com anemia relativamente ao grupo sem anemia enquanto o Maf está diminuído no grupo com anemia comparando ao grupo sem anemia. Comparando os valores em ambos os grupos, verifica-se que o LHD em pacientes sem anemia, está dentro dos valores de referência descritos por Dopsaj *et al.*, 2012 e EHY *et al.*, 2014, enquanto o Maf está ligeiramente mais baixo (0,7 valores). Em relação a pacientes com anemia, o LHD está aumentado (7,9%) e o Maf diminuído

(8,9). O valor de Maf é diretamente proporcional aos valores da hemoglobina e do VCM, logo numa anemia, basta um destes valores estar diminuído que o valor de Maf também diminui.

No grupo com anemia o parâmetro LHD tem um significado estatístico em relação ao VCM, recetor solúvel da transferrina, hemoglobina e Maf (tabela 4). Destes 4 parâmetros com significado estatístico, o VCM tem uma correlação muito forte com o LHD, correlacionando-se negativamente ( $r = -0,68$ ), quando o valor de VCM diminui, o valor de LHD aumenta. A hemoglobina correlaciona-se fracamente ( $r = -0,34$ ). Relativamente ao grupo sem anemia, o VCM ( $r = -0,46$ ) a hemoglobina ( $r = -0,36$ ) e o Maf ( $r = -0,47$ ) relacionam-se moderadamente e negativamente com o LHD. Na figura 7 observámos a correlação entre VCM e LHD, verificando uma maior dispersão nos pontos do grupo sem anemia, o que causa um coeficiente de correlação pior. Estas diferenças entre os grupos com e sem anemia, podem dever-se ao facto de que no grupo sem anemia, a população é mais heterogénea. Relativamente ao parâmetro Maf e a sua interação com os restantes parâmetros observámos que tanto o VCM (figura 13) como a hemoglobina (figura 15) se correlacionam fortemente nos dois grupos. Esta relação pode ser explicada pelo facto do Maf derivar do valor da hemoglobina e do VCM. Avaliando os dados em relação à presença ou não de ferropénia, verificámos que mais de metade dos pacientes que apresentam deficiência de ferro não apresentam uma patologia anémica (figura 19). Estes dados são importantes dado que a anemia é uma consequência e não uma causa. Dentro do quadro “sem ferropénia” é possível observar 3 pacientes com anemia (figura 19), no entanto, a causa desta anemia provém de outras origens que não a deficiência de ferro (talassémias, deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ou ácido fólico, *etc*). Tendo em conta que o objetivo do nosso trabalho se centra em avaliar a importância do Maf e do LHD como fator precoce, o grupo mais importante é o grupo sem anemia.

O LHD está elevado no grupo com anemia relativamente ao grupo sem anemia (tanto no grupo com ferropénia como no grupo sem ferropénia, tabela 5). No grupo sem anemia (grupo com ferropénia e grupo sem ferropénia), este parâmetro está dentro dos valores de referência estabelecidos.

O Maf, no grupo sem ferropénia e sem anemia está dentro dos valores de referência (12,6), no entanto no grupo com anemia já está mais baixo. No grupo sem anemia, mas com ferropénia este valor também está abaixo do valor de referência (11,2), podendo desta forma ser um parâmetro precoce da anemia. Quando comparados estes dois

grupos dentro da ferropénia, observou-se uma significância estatística muito alta ( $p < 0,001$ ), sendo que no grupo sem ferropénia esta significância já não foi tão elevada ( $p = 0,01$ ).

Na tabela 6, estão representados os coeficientes de correlação em conjunto com o *P value* correspondente. Em relação ao LHD, dentro do grupo com ferropénia e com anemia temos 1 parâmetro que se correlaciona fortemente, o VCM ( $r = -0,67$ ), no entanto, no grupo com ferropénia e sem anemia, não existe nenhum parâmetro que se correlacione fortemente. No grupo sem ferropénia, nenhum dos parâmetros se correlaciona com o LHD e isto pode ser explicado pelo baixo número de amostras ( $n$  total = 12).

Relativamente ao Maf, existem 2 parâmetros que se correlacionam fortemente, a hemoglobina e o VCM. Esta excelente relação verifica-se tanto no grupo com ferropénia (com e sem anemia) como no grupo sem ferropénia (sem anemia) (figuras 26, 27, 32 e 32).

Comparando entre o grupo com e sem anemia, dentro da ferropénia, o LHD apresenta um coeficiente de correlação do VCM (figura 21) diferente de um grupo para o outro, sendo mais forte no grupo com anemia.

No caso do sexo masculino, 74% da amostra revela não ter anemia, sendo a população anémica minoritária (figura 34).

Na tabela 7, podemos verificar que o LHD está aumentado na anemia em relação a sem anemia, e o Maf está diminuído em pessoas com anemia em comparação com pessoas sem anemia. Reparando nos valores de referência por Dopsaj *et al.*, 2012 e EHY *et al.*, 2014, verifica-se que o LHD está dentro dos valores de referência tanto em pacientes com anemia como em pacientes sem anemia. No entanto, o Maf, esta diminuído como seria de esperar no grupo com anemia, e dentro dos valores de referência no grupo sem anemia.

Relativamente ao LHD apenas 2 dos coeficientes de correlação são fortes, o do recetor solúvel da transferrina ( $r = 0,69$ ) e o VCM ( $r = -0,71$ ), no entanto apenas no grupo com anemia (tabela 8). No grupo sem anemia, os parâmetros apresentam quase todos um coeficiente moderado e o VCM chega mesmo a apresentar um coeficiente fraco ( $r = -0,19$ ). Esta diferença do VCM entre os dois grupos está representada na figura 35.

Para o Maf, a hemoglobina apresenta um coeficiente de correlação elevado tanto para o grupo com anemia ( $r = 0,78$ ) como para o grupo sem anemia ( $r = 0,86$ ). Já o VCM apresenta um coeficiente de correlação moderado em ambos os grupos (Figura 44).

Analisando agora a ferropénia *vs.* sem ferropénia, no ponto 4.1.2.2., observamos uma distribuição dos pacientes equilibrada, dado que metade tem anemia e a outra metade não. Também se verifica que em relação ao grupo sem ferropénia apenas 11 pacientes têm um quadro de anemia não relacionado pela deficiência de ferro.

O VCM, o LHD e a ferritina, não obtiveram uma diferença estatística significativa quando comparados dentro do grupo com ferropénia (tabela 9). Ainda dentro deste grupo, o LHD e o Maf comportam-se de maneira semelhante ao verificado no sexo feminino: o LHD perante uma anemia aumenta (6,9) enquanto o Maf diminui (9,3). No grupo sem ferropénia, o VCM e o LHD apresentam significado estatístico quando comparados dentro dos grupos com e sem anemia. O LHD e o Maf mais uma vez apresentam o mesmo padrão de resultados (com anemia, LHD aumenta enquanto o Maf diminui) (tabela 9). Relativamente aos valores de referência, o LHD está normal em todos os grupos estudados, no entanto o Maf, ao contrário do que se verifica no sexo feminino, está dentro dos valores de referência nos grupos sem anemia, não se verificando uma diminuição no grupo com ferropénia e sem anemia (tabela 9).

Na tabela 10 é possível verificar a relação dos parâmetros já analisados para diagnóstico com o LHD e o Maf. O LHD no grupo com ferropénia e com anemia, apresenta os seguintes fatores de correlação fortes: VCM ( $r = -0,73$ ) e o recetor solúvel da transferrina ( $r = 0,68$ ). No grupo sem anemia, o ferro ( $r = -0,76$ ), o recetor solúvel da transferrina ( $r = 0,67$ ) e a saturação da transferrina ( $r = -0,73$ ) apresentam uma correlação forte com o LHD. Verificando agora o grupo sem ferropénia. Apenas o recetor solúvel da transferrina ( $r = 0,70$ ) no grupo com anemia apresenta uma forte relação com o LHD. A hemoglobina, não apresenta sequer significado estatístico em nenhum dos grupos.

Quanto ao Maf, no grupo com ferropénia, como expectável apresenta uma forte correlação com a hemoglobina tanto no grupo com anemia como no grupo sem anemia (Figura 58). No entanto, em relação ao VCM, este no grupo com anemia tem um coeficiente de correlação moderado ( $r = 0,60$ ) apenas existindo uma forte relação no grupo sem anemia ( $r = 0,80$ ) (figura 59). O recetor solúvel da transferrina também

apresenta uma forte relação com Maf no grupo com anemia ( $r = -0,73$ ), já não se verificando o mesmo no grupo sem anemia ( $r = -0,54$ ) (figura 62).

No grupo sem ferropénia, é possível observar a forte relação na mesma com a hemoglobina em ambos os grupos (figura 68), no entanto o VCM não apresenta uma forte correlação em nenhum dos grupos (figura 69).

Analisando apenas a relação entre LHD (avalia hipocromia) e Maf (fator microcítico), é possível observar que em nenhuma situação (anemia, não anemia, ferropénia, sem ferropénia) e em nenhum dos sexos, estes dois fatores se relacionam fortemente.

É possível observar também que dentro do grupo com anemia, o LHD tem valores mais baixos numa situação de ferropénia. Pacientes sem ferropénia e sem anemia, são os pacientes com valores mais baixos de LHD (3,8), seguidos de pacientes com ferropénia, mas sem anemia (4,2). Relativamente ao Maf, este adquire valores mais baixos no geral na população anémica, independentemente da existência ou não de ferropénia. No entanto, é possível observar que o valor mais alto do Maf (14,6) é na população sem nenhuma patologia associada (sem ferropénia e sem anemia). Estes valores podem ser observados na tabela 6 e na tabela 9.

Observando a tabela 11 verificamos que o LHD apesar de ter pouca especificidade (34,2%) tem uma sensibilidade boa (73,2%), desta forma, nas situações em que o LHD está elevado pode nos ajudar a excluir a doença. Relativamente ao Maf, este parâmetro tem uma boa especificidade (79,7%) e uma sensibilidade moderada (56,9), ou seja, para valores abaixo dos valores de referência poderá ser um auxílio no diagnóstico. Comparando os valores de especificidade e sensibilidade determinados por nós com os valores descritos na bibliografia, o LHD e o Maf, na população em estudo apresentam valores mais baixos<sup>13,15</sup>. Estas diferenças podem ser explicadas pelo facto das populações em estudo terem características diferentes e serem populações muito específicas, por exemplo, atletas de alta competição.

Quando se compara o sexo feminino com o sexo masculino, é possível observar dois fatores importantes: em ambos os sexos, em caso de anemia (com uma ferropénia ou não instalada), o valor de LHD aumenta, e o valor de Maf diminui. O sexo feminino em relação ao LHD possui valores mais elevados deste, no entanto, quanto ao Maf o sexo masculino possui valores mais elevados.

## 6. Conclusão e Perspetivas futuras

Com este estudo foi possível mostrar que os novos parâmetros hematológicos LHD e Maf refletem a presença de anemia estando assim de acordo com a bibliografia descrita. O LHD aumenta na presença de anemia e o Maf diminui (anemia *vs.* sem anemia), sendo o Maf o parâmetro que apresenta mais alterações

É importante realçar, que apesar do número de pacientes utilizados neste estudo, é necessária uma amostra ainda mais abrangente (inclusão de mais tipos de anemia, por exemplo), com um maior número de amostra para reforçar os resultados obtidos.

A existência destes novos parâmetros, pouco estudados, e a dificuldade de diagnóstico de deficiência de ferro, foi o que motivou a realização deste projeto. Os resultados obtidos sugerem que tanto o LHD como o Maf isolados não identificam uma situação de ferropénia precoce. No entanto em conjugação com os restantes parâmetros hematológicos, como o VCM, a hemoglobina, a ferritina, a saturação da transferrina e o recetor solúvel da transferrina, podem ajudar na identificação e caracterização de anemia precoce.

Concluindo, o Maf e o LHD em associação com os parâmetros já estabelecidos podem ajudar a caracterizar situações precoces de ferropénia, tendo a vantagem de serem parâmetros determinados no hemograma sem a necessidade de recorrer a análises de soro e outras metodologias. No futuro é necessária uma investigação mais aprofundada em diferentes fases da anemia ferropénia, tratamento, incluindo outras anemias de forma a aumentar a utilidade destes novos parâmetros.



# **Capítulo 2: Relatório de Estágio**

## **1. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica**

O Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB) integra o laboratório localizado no Hospital Pêro da Covilhã, e laboratório do Hospital do Fundão<sup>20</sup>. Este serviço engloba diversos sectores: Imunoquímica, Microbiologia, Virologia, Hematologia, Urgência, Autoimunidade entre outros. Todos os setores estão em constante comunicação de forma a otimizar o tratamento das amostras em tempo útil. Relativamente à equipa do serviço de Patologia Clínica esta inclui técnicos de diagnóstico e terapêutica, técnicos superiores, patologistas clínicos, assistentes técnicos e técnicos administrativos<sup>20</sup>. Relativamente às amostras, estas poderão ser várias, como sangue, urina, fezes, expetorações, lavados e aspirados, e são colhidas de acordo com o Manual de Colheitas em diferentes contentores consoante o tipo de amostra e a análise necessária<sup>21</sup>. Os contentores são identificados antes da colheita com o nome do doente, idade, sexo, número do processo, a data da colheita e um código de barras específico para cada doente com os parâmetros de análises solicitados.

## **2. Procedimento Analítico**

Existem três fases analíticas muito importantes em qualquer laboratório de análises: a fase pré-analítica, a fase analítica e a fase pós-analítica.

### **2.1. Fase Pré-Analítica**

A fase pré-analítica é fase que detém maior atenção sendo também a mais propícia a erros humanos. Esta fase inicia-se com pedido dos exames pelo médico, inclui ainda a preparação do paciente e a colheita, bem como o transporte da amostra e a triagem desta (centrifugação, alíquotagem e distribuição pelos diversos setores)<sup>22</sup>. Termina quando se inicia o procedimento para a realização do processo analítico. O SPC tem um equipamento pré-analítico automatizado, com o intuito de minimizar os erros e agilizar

o processo. Este equipamento, o Cobas p612 (Figura 74), identifica as amostras através da leitura do código de barras do contentor e da cor da tampa do mesmo, deteta os níveis de líquidos que os tubos contêm e verifica as características das amostras (por exemplo, icterícia, lipemia e hemólise)<sup>23</sup>. O Cobas p612 está programado para distribuir as amostras para diferentes suportes de acordo os exames que necessitam de ser realizados<sup>23</sup>. Este sistema pré-analítico contém ainda um módulo para executar alíquotas, garantindo assim a rentabilização da amostra. Depois de todos os exames realizados, a amostra será arquivada sendo-lhe atribuída uma posição de forma a conseguir rastreá-la caso seja necessário. O rastreamento da amostra é garantido pois o Cobas p612 está associado a um programa, o *Infinity*. Os arquivos são guardados numa câmara frigorífica durante sete dias. No entanto, existem tubos que têm de ser manuseados e distribuídos manualmente como os tubos pediátricos e os tubos de urina para análise de sedimentos. Estas exceções ocorrem, pois, o Cobas p612 está programado para certos tamanhos de tubos, não aceitando outros.



Figura 72- Representação do sistema pré-analítico Cobas® p612 utilizado no SPC. Figura adaptada de Folheto Informativo Cobas p612.

## 2.2. Fase Analítica

O processo analítico começa pela verificação e manutenção dos equipamentos utilizados. De seguida ocorre a preparação dos reagentes, a calibração e verificação dos controlos<sup>24</sup>. Nesta fase também estão inseridos os critérios de validação dos resultados e verificação da qualidade da amostra<sup>25</sup>. Os calibradores e controlos são bastantes importantes neste processo analítico pois só assim se consegue calibrar as técnicas e apreciar a exatidão e precisão dos resultados:

- Calibradores: Amostra de composição definida qualitativa e quantitativamente aferida em relação a padrões de referência<sup>25</sup>. Destina-se à calibração das técnicas. Esta amostra irá estabelecer uma relação entre os valores medidos, como por exemplo, os valores de absorvância ou sinais de electroquimioluminescência (ECL) e os resultados correspondentes, neste caso a concentração de um analito.
- Controlo: Amostra adaptada aos métodos utilizados, destina-se ao cálculo da precisão e exatidão<sup>25</sup>.

O controlo de qualidade interno (CQI) é realizado diariamente, antes de processar qualquer amostra de doentes e permite a verificação da qualidade dos procedimentos internos. Cada controlo irá ter uma média e um desvio padrão correspondente, sendo que em alguns casos, o mesmo controlo pode ser usado para mais que um parâmetro. Os valores dos controlos são comparados com os valores descritos pela casa comercial. Para análise dos resultados dos controlos aplica-se as regras de Westgard com objetivo de padronizar a interpretação dos resultados: se um valor estiver fora dos três desvios padrão, então aplica-se a regra de rejeição; se houver um resultado fora dos dois desvios padrão, nesse caso aplica-se a regra de advertência<sup>26</sup>. De forma a corrigir estes valores alterados é possível proceder-se de diferentes formas como por exemplo, repetir a calibração ou mudar de reagentes<sup>25</sup>. Os resultados dos controlos são enviados para o sistema informático do laboratório, o *Modulab*.

O controlo de qualidade externo (CQE), é tratado como se fosse uma amostra de um doente, sendo que os resultados obtidos serão posteriormente enviados para as entidades competentes<sup>25</sup>. Fazem parte destas entidades a Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratórios (SEQC), *United Kingdom National External Quality Assessment* (NEQAS) e Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge (INSA).

Após a calibração e os controlos, as amostras biológicas podem então ser estudadas. Os resultados serão exportados para o *Modulab* automaticamente.

### **2.3. Fase Pós-Analítica**

A fase pós-analítica desempenha um papel importante também, pois é nesta fase que se insere a validação biopatológica e a emissão dos resultados obtidos. A validação biopatológica consiste na validação dos resultados obtidos de um paciente de acordo com o seu histórico clínico, o seu tratamento e/ou o seu diagnóstico<sup>27</sup>.

## 3. Laboratório de Imunoquímica

O laboratório de imunoquímica compreende duas áreas: a área da bioquímica e a da imunologia. Este tem como objetivo contribuir para uma boa caracterização de alterações associadas ao sistema imunitário bem como alterações a nível químico e bioquímico.

### 3.1. Química Analítica

#### 3.1.1. Cobas® Serie 8000

O equipamento Cobas® série 8000 (figura 75) é um analisador modular automatizado que possui um modulo ISE e mais três módulos analíticos: um modulo de química, o c502, e dois módulos de imunologia, e602.

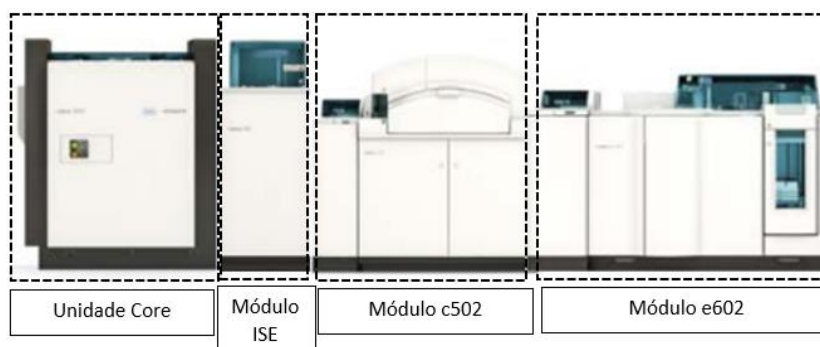


Figura 73- Representação do Cobas® Serie 8000 existente no SPC do CHUCB.

- Cobas® Série 8000 Módulo ISE

Este módulo mede a concentração de íons cloro, sódio e potássio através de potenciometria indireta<sup>28</sup>. Esta técnica consiste na permeabilidade de uma membrana seletiva existente num eletrodo, o respetivo ião em estudo quando atravessa a membrana vai criar uma diferença de potencial elétrico, força eletromotriz sendo esta determinada pelo eletrodo e desta forma calculada a concentração do respetivo ião<sup>28</sup>.

- Cobas® Série 8000: Módulo c502

O módulo c502 tem capacidade de usar dois tipos de ensaios: ensaio fotométrico ou ensaio imunoturbidimétrico. O método fotométrico consiste na mistura da amostra em análise com o reagente específico numa cuvete de reação, sendo depois misturados por

um agitador ultrassônico incorporado no equipamento<sup>28</sup>. A reação provocada por esta mistura irá produzir uma intensidade de cor que corresponde à concentração do analito em causa. Quando o feixe de luz alcança o fotômetro depois de ter atravessado a cuvete de reação, este incide numa grelha de difração separando a luz nos comprimentos de onda que a constituem refletindo-os posteriormente para uma matriz fixa de 12 fotodíodos<sup>28</sup>. Cada um dos fotodíodos deteta um comprimento de onda diferente sendo possível desta forma calcular as concentrações de cada analito. A concentração do analito é diretamente proporcional à intensidade de cor por ele gerada.

O método imunoturbidimétrico é um tipo de imunoensaio utilizado para medir concentrações de complexos antigénio-anticorpos e outras proteínas de grandes dimensões. Neste método a concentração é medida de forma diferente, ou seja, quanto maior a turbidez da amostra e menor o sinal de luz emitido, maior a concentração do analito na amostra<sup>29</sup>.

Parâmetros analisados pelo método fotométrico: Ácido úrico, Amicacina,  $\alpha$ -Amílase, Aspartato Aminotransferase, Alanina Aminotransferase, Bilirrubina Direta, Bilirrubina Total, Cálcio, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Colesterol Total Creatina Cinase, Creatinina, Ferro, Fosfatase Alcalina, Fósforo,  $\gamma$ -Glutamilttransferase, Magnésio, Proteínas Totais, Triglicéridos e Ureia.

Parâmetros analisados pelo método imunoturbidimétrico: Alfa-1-Antitripsina, Cadeias leves livres ( $k$  e  $\lambda$ ), Beta-2-microglobina, C3 e C4, Enzima de Conversão de Angiotensina, Fator Reumatoide, Haptoglobina, IgA, IgG, IgM, Lipoproteína A, Proteína C Reativa, Transferrina, Recetor Solúvel da Transferrina.

- Cobas® Série 8000: Módulo e602

Este módulo utiliza uma técnica de deteção diferente: a electroquimioluminescência. Este método indireto de quantificação, consiste na ligação entre o analito e um anticorpo monoclonal específico para o analito (por exemplo, se o analito é a toxoplasmose então o ligando é um anticorpo anti-toxoplasmose) (Técnica *Sandwich*), e este terá de conter biotina<sup>29</sup>. Um segundo ligando será um anticorpo monoclonal com ruténio que irá reagir com a amostra e o anticorpo monoclonal biotilado<sup>29</sup>. Posteriormente ainda será adicionado micropartículas revestidas por estreptavidina, que tem uma elevada afinidade com a biotina, e desta forma o complexo anteriormente formado irá ligar-se à fase sólida<sup>29</sup>. A mistura de reação é depois aspirada para a célula de leitura em que as micropartículas irão ser fixadas magneticamente à superfície do

elétrodo<sup>28</sup>. De seguida, aplica-se uma corrente elétrica ao eletrodo induzindo desta forma a emissão de luz quimiluminescente, sendo esta medida por um fotomultiplicador<sup>28</sup>. Quanto maior for a concentração do analito presente na amostra, maior será também a luz quantificada.

Através desta técnica são analisados os seguintes parâmetros: Ferritina, Antígeno Específico da Próstata (total e livre), TSH, T3 Livre e T4 Livre, Folatos, Vitamina D e B12, Paratormona, CA 19.9, CA 15.3, CA 125, CEA, AcHCV, AchIV, AchBS, AgHBS, AchBc, Treponema Pallidum (Sífilis), Rubéola (IgM e IgG), Toxoplasmose (IgM e IgG) e ainda Citomegalovírus (IgM e IgG).

### **3.1.2. Abbott Architect i2000SR**

Neste equipamento são realizados vários parâmetros como marcadores cardíacos, entre eles a homocisteína, hormonas da fertilidade (LH, FSH, Prolactina, progesterona, estradiol, testosterona, estrogénio, prolactina, SHBG), hepatites (A, B e C), vírus como Epstein-Barr e HTLV tipo I e II, proteínas tiroideias como a anti-tiroglobulina e anti-peroxidase tiroideia, treponema Pallidum e o cortisol. É possível também realizar testes de afeidez para a rubéola, toxoplasmose e ainda para a Hepatite A com o objetivo de identificar se a infeção é recente/aguda ou antiga. Estes testes são realizados através do imunoensaio enzimático quimiluminescente. Esta técnica baseia-se na ligação de anticorpos presentes na amostra às micropartículas revestidas com os antígenos a analisar<sup>30</sup>. Num segundo passo, o conjugado de anticorpos anti-humanos marcados com acridina ou outro substrato quimiluminescente são adicionados<sup>30</sup>. A acridina é o marcador luminescente sendo que é a partir desta que se calcula a concentração de analito. Quanto mais luz gerada, maior a concentração de analito.

### **3.1.3. Atellica® NEPH 630 System**

O Atellica® é um sistema desenhado pela Siemens Healthineers. Este é usado no SPC para determinar concentração das cadeias leves livres em amostras de soro e plasma EDTA através do método da imunonefelometria<sup>31</sup>. Esta técnica baseia-se em partículas poliestireno revestidas com anticorpos para as cadeias leves livres (*kappa* ou *lambda*) que aglutinam quando misturadas com amostras contendo estas cadeias livres<sup>31</sup>. As cadeias leves fazem parte das imunoglobulinas, em indivíduos saudáveis circulam em baixa concentração na forma livre, sendo eliminadas pelos rins<sup>31</sup>.

## **3.2. Testes Imunológicos**

### **3.2.1. ImmunoCAP™ 250**

O ImmunoCAP™ 250 é um equipamento utilizado para a detecção de alergias a ácaros, alimentos, ervas, polens de árvores, animais com pêlo, por exemplo. É utilizado também para pesquisa de parâmetros associados a doenças inflamatórias intestinais, como a calprotectina.

Este equipamento utiliza a técnica ELISA num imunoensaio sandwich, onde ocorrem reações antigénio-anticorpo: o alergénio em questão, está ligado ao ImmunoCAP (fase sólida), reagindo com as imunoglobulinas E (IgE) presentes na amostra<sup>32</sup>. Numa segunda fase, são adicionados anticorpos marcados com uma enzima anti-IgE humana (conjugado), formando um complexo<sup>32</sup>. Quando maior for a resposta, maior a presença de IgE na amostra. As IgE específicas do paciente, devem-se a um primeiro contacto com o alergénio, podendo não ocorrer uma reação alérgica imediata, por isso, este teste permite também perceber a sensibilidade do paciente para aquele alergénio em específico, de forma a identificar uma provável alergia, mesmo antes de sintomas.

Para a quantificação da calprotectina usa-se o ensaio imunoenzimático (EIA). A fase sólida está revestida com anticorpos monoclonais anti-calprotectina<sup>33</sup>. Se esta proteína estiver presente na amostra ocorre uma ligação. Numa segunda fase, são adicionados anticorpos anti-calprotectina marcados com uma enzima formando-se um complexo calprotectina-conjugado<sup>33</sup>. À semelhança do procedimento da IgE, vai ocorrer uma incubação com a solução de desenvolvimento, seguida da paragem desta reação e leitura da fluorescência emitida pela reação<sup>33</sup>. A concentração de calprotectina é diretamente proporcional à intensidade da fluorescência. A calprotectina tem de ser extraída das fezes do paciente através de um kit de extração.

## **3.3. Eletroforese de Proteínas Séricas**

A eletroforese capilar é realizada através do equipamento Sebia CAPILLARYS 3 Octa. No mesmo equipamento, através de uma imunosubtração poderemos realizar a caracterização do componente monoclonal. A mesma caracterização poderá ser efetuada por uma imunofixações sérica, recorrendo ao Sebia HYDRASIS Focusing. A eletroforese consiste na separação de frações proteicas com base na sua carga, após estas estarem sujeitas a um campo elétrico.

### 3.3.1. **Sebia CAPILLARYS 3 OCTA**

A eletroforese capilar consiste num capilar com as extremidades em recipientes com um tampão contendo um elétrico<sup>34</sup>. A amostra é então introduzida no capilar na extremidade positiva (ânodo), substituindo o reservatório do tampão por um reservatório com a amostra, aplicando um potencial elétrico durante alguns segundos, voltando depois ao reservatório do tampão<sup>35</sup>. A aplicação do potencial irá provocar o movimento dos analitos em direção ao detetor. O proteinograma é o resultado desta técnica e é crucial para o diagnóstico de gamapatias monoclonais, bem como de outras doenças, por exemplo, patologias renais ou hepáticas. Através do proteinograma separamos as proteínas circulantes do soro em seis frações: Albumina, Alfa-globulina (alfa 1 e alfa 2), Beta-globulina (beta 1 e beta 2), e gamaglobulina. O diagnóstico é feito de acordo com o tipo de alteração observada em cada fração. Esta análise deve ser apenas feita em soro, de forma a evitar potenciais interferências como proteínas de coagulação (fibrinogênio).

### 3.3.2. **Sebia HYDRASIS Focusing**

A imunofixação ajuda a caracterizar as imunoglobulinas monoclonais detetadas nos proteinogramas por eletroforese capilar.

- Imunofixação sérica

A imunofixação sérica (Figura 74) consiste na separação das proteínas de acordo com as suas cargas, num segundo passo, aplica-se os antissoros (imunoglobulinas anti-humanas)<sup>36</sup>. Os antissoros irão se ligar às proteínas correspondentes. No final, o gel é corado e revelado a presença ou ausência das proteínas.

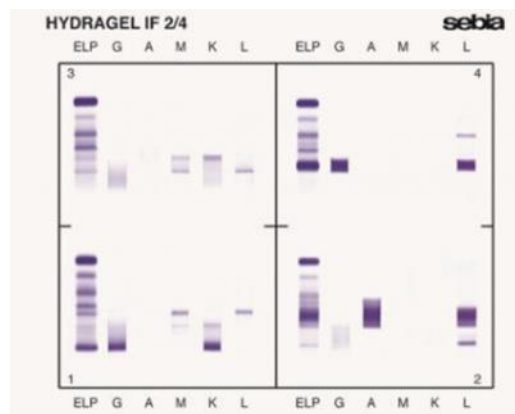


Figura 74- Exemplo de um gel de Imunofixação Sérica. Figura adaptada de Sebia HYDRASIS Focusing, Bula IF Sérica.

- Imunofixação Urinária

Em relação à imunofixação urinária, podemos usar dois tipos diferentes de géis: perfil urinário e Bence-Jones. Na escolha do gel é preciso ter em conta o valor das proteínas na urina: quando superior a 150 mg/24h usamos o gel de perfil urinário. Se este valor for inferior utilizamos o gel *Bence-Jones*.

A imunofixação de um perfil urinário (Figura 75-A) é aplicada para caracterizar a proteinúria. Com o gel *Bence-Jones* detetamos a proteinúria tipo *Bence-Jones* (cadeias leves livres *kappa* e *lambda*). O gel de perfil urinário deteta a proteína *Bence-Jones* e ainda proteínas glomerulares e tubulares<sup>37</sup>.

A imunofixação do gel *Bence-Jones* (Figura 75-B) identifica cadeias leves livres na urina, dado que estas só aparecem na urina quando são produzidas em grandes concentrações e o organismo não as consegue metabolizar<sup>38</sup>. As cadeias leves são parte integrante das imunoglobulinas, estando ligadas às cadeias pesadas. Sabe-se que as cadeias leves são sintetizadas em maior quantidade que as cadeias pesadas nos plasmócitos, resultando num excesso de cadeias leves livres no sangue periférico<sup>39</sup>. Normalmente, estas cadeias leves livres em excesso são eliminadas, não existindo uma acumulação destas no organismo. O aumento significativo destas representa uma alteração na produção das imunoglobulinas. Estas proteínas estão associadas a um mau prognóstico, sendo características de um mieloma múltiplo<sup>39</sup>.

Tanto a imunofixação *Bence-Jones* como a imunofixação de um perfil urinário pode ser realizada em urina 24 horas e em soro.

No caso da imunofixação urinária desta proteína, o antissoro usado é contra cadeias pesadas G, A e M (antissoro trivalente), cadeias leves *Kappa* e *Lambda*, e cadeias leves *Kappa* e *Lambda* livres<sup>38</sup>.

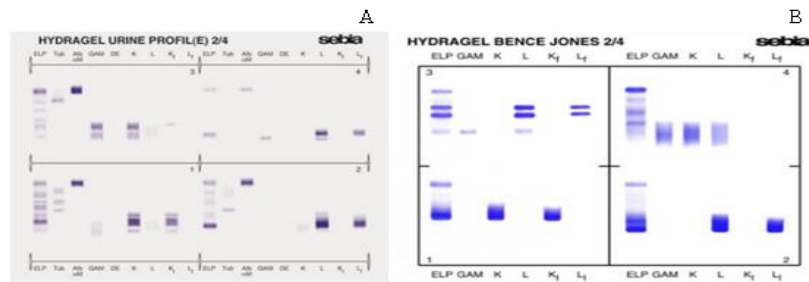


Figura 75- (A) Exemplo de uma imunofixação em gel para perfil urinário. Figura adaptada de Sebia HYDRASIS Focusing, Bula IF Perfil Urinário. (B) Exemplo de uma imunofixação em gel para pesquisa de proteínas *Bence-Jones*. Figura adaptada de Sebia HYDRASIS Focusing.

### 3.4. Virologia

#### 3.4.1. Sistema Cobas® 4800

O sistema Cobas® 4800 possui dois equipamentos: Cobas x480 e Cobas z480. Estes dois equipamentos são completamente automatizados e são utilizados no diagnóstico de patologias como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Hepatite C (HCV) e o Vírus do Papiloma Humano (HPV), através de técnicas de Biologia Molecular, mais concretamente através da técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR).

Através do Cobas x480 ocorre a extração e purificação dos ácidos nucleicos<sup>40</sup>. Os ácidos nucleicos extraídos são adicionados a uma solução com micropartículas magnéticas, estas ligam-se aos ácidos nucleicos por afinidade<sup>40</sup>. De seguida, realiza-se uma eluição para quebrar as ligações ácidos nucleicos-micropartículas magnéticas, obtendo-se desta forma ácidos nucleicos com uma grande percentagem de pureza<sup>40</sup>. Numa segunda etapa procede-se à amplificação e deteção por PCR, realizado no Cobas z480, um termociclador. A técnica PCR baseia-se na amplificação de uma determinada sequência genómica e divide-se em três fases distintas: desnaturação (produção de duas cadeias simples de DNA), *annealing* (ligação dos *primers* às cadeias simples) e extensão (DNA polimerase adiciona os *dNTPs* livres)<sup>41</sup>. Estes três processos constituem um ciclo de PCR, sendo necessário vários para obter uma quantidade suficiente de cópias da sequência-alvo. A deteção é feita com uma sonda contendo um corante fluorescente e um corante *quencher* (Sistema *TaqMan*).

### **3.5. Testes de Imunofluorescência**

Os testes de imunofluorescência baseiam-se no método da imunofluorescência indireta (IFA), existindo uma reação antigénio-anticorpo. Para análise de resultados, o complexo antigénio-anticorpo é marcado com fluoresceína, sendo as amostras depois observadas num microscópio de fluorescência<sup>42</sup>.

#### **3.5.1. Pesquisa de *Coxiella burneti* I+II IFA IgG/IgM**

A *Coxiella burneti* é uma bactéria intracelular agente causador da febre Q<sup>42</sup>. Esta doença pode originar pneumonias, febres, hepatites e ainda endocardite. O teste IFA é o mais sensível e o mais específico para deteção da resposta IgM. Esta imunoglobulina surge a partir da segunda semana da doença e a partir do terceiro mês tornam-se indetetáveis. A IgG aparece nas 4 a 8 semanas após a infeção.

#### **3.5.2. Pesquisa de *Rickettsia conorii* IFA IgG**

A bactéria *Rickettsia conorii* é responsável pela febre escaro-nodular mediterrânea que se caracteriza pelo aparecimento de febre ou de inoculação no lugar da picada da carraça<sup>42</sup>. A técnica IFA é mais utilizada devido à sua simplicidade e à ausência de reações cruzadas. Esta técnica põe em evidência anticorpos tipo IgG<sup>42</sup>.

### **3.6. *SediMax* e *AutionMax***

O *sediMax* em conjunto com o *autionMax* é um sistema automatizado para a análise de urinas, permitindo obtenção de parâmetros químicos e de sedimentos.

O *sediMax* analisa o sedimento urinário com o objetivo de determinar quantitativamente parâmetros como os leucócitos, macrófagos e células epiteliais através da visualização deste pelo microscópio existente no equipamento<sup>43</sup>.

O *autioMax* realiza uma análise semi-quantitativa através da leitura de tiras de reagentes *Uriflet S*, analisando os parâmetros de glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, pH, hemoglobina, corpos cetónicos, nitritos e leucócitos<sup>43</sup>. Este sistema automatizado ajuda à eliminação de erros humanos.

## **3.7. Testes Rápidos**

Os testes rápidos são usados para detecção de drogas de abuso ou de uma gravidez e são realizados com amostras de urina.

### **3.7.1. Pesquisa de Drogas de Abuso**

O *One Step Drug Screen* é um imunoensaio cromatográfico utilizado na detecção de drogas de abuso na urina<sup>44</sup>. As drogas de abuso detetadas são: marijuana (THC), anfetaminas, morfina, cocaína, benzodiazepinas. Se não existirem drogas na urina, então não irá haver saturação dos locais de ligação ao anticorpo específico reagindo com o conjugado. Desta forma, irá aparecer uma linha colorida na região da linha de teste<sup>44</sup>. Na presença de drogas, os locais de ligação ao anticorpo irão ficar saturados, não sendo possível observar a linha colorida na região da linha de teste<sup>44</sup>.

### **3.7.2. Teste de Gravidez**

O teste rápido *VISITECT Pregnancy* é um imunoensaio *Sandwich*, que se baseia na ligação de gonadotrofina coriônica humana (hCG) presente na amostra e o anticorpo existente no teste<sup>44</sup>. Durante o teste, e enquanto a amostra flui através da membrana, o conjugado monoclonal anti-hCG liga-se à hCG presente na amostra<sup>44</sup>. Quando este complexo se forma, irá originar um linha cor-de-rosa, confirmando um resultado positivo<sup>44</sup>. Se não existir hCG na amostra, então não existirá ligação ao conjugado, não aparecendo a linha colorida na região do teste.



## 4. Laboratório de Microbiologia

A secção de microbiologia do SPC do CHCUB identifica e caracteriza a presença de bactérias, vírus, parasitas e fungos em diferentes amostras biológica para que se encontre a melhor terapêutica para o doente.

### 4.1. Análise Microscópica

A análise ao microscópio de microrganismos é uma etapa essencial para validação da qualidade da amostra bem como para direcionar o estudo posterior. O microscópio cumpre dois principais objetivos: deteção inicial de micróbios e uma identificação preliminar ou definitiva dos organismos<sup>45</sup>.

Existem duas formas para a realização de estudos ao microscópio, observação direta ou através de colorações diferenciais. A observação através de colorações diferenciais tem como principal objetivo a coloração de organismos ou até componentes celulares, dependendo do tipo de corantes usados e é a partir desta que se encontram os dois principais métodos de coloração usados no Laboratório de Microbiologia do CHUCB: a coloração de Gram e a Coloração Álcool-Ácido Resistente<sup>45</sup>.

#### 4.1.1. Coloração de Gram

A coloração de *Gram* é um dos procedimentos realizados no laboratório de microbiologia com mais relevância, obtendo-se resultados rápidos e fornecendo informações importantes de forma a direcionar a terapêutica antimicrobiana<sup>46</sup>. Com esta coloração iremos ter dois grupos distintos de microrganismos: *gram* positivos e *gram* negativos. As bactérias *gram*-positivas, depois de fixadas à chama e coradas com violeta de cristal e iodo (mordente), fixam o corante e quando se aplica o descolorante (álcool ou acetona), o corante não é removido<sup>45</sup>. Desta forma, as bactérias *gram*-positivas irão possuir uma cor purpura característica. Isto deve-se ao facto de estas bactérias possuírem uma parede celular porosa de peptidoglicanos, que deixa passar o corante para a membrana plasmática (Figura 76). As bactérias *gram*-negativas são células que possuem paredes celulares mais complexas que as bactérias *gram*-positivas, contendo duas camadas exteriores à membrana citoplasmática, bem como

uma camada muito fina de peptidoglicanos perdendo a cor quando se aplica o descolorante, como se pode observar pela figura 76<sup>45</sup>.

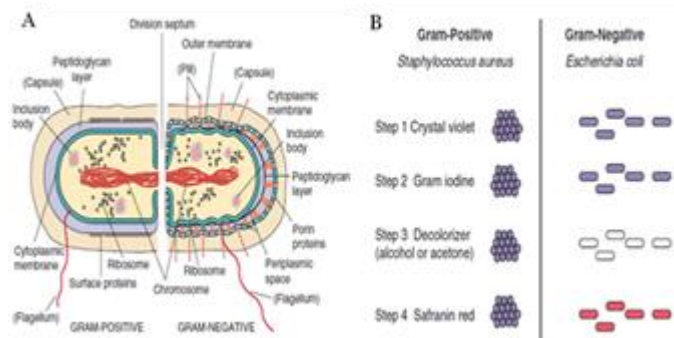


Figura 76- Diferenças entre bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas. (A) Diferenças morfológicas. (B) Diferenças durante o procedimento da coloração de Gram. Adaptado de Murray *et al*, 2016<sup>45</sup>.

#### 4.1.2. Coloração Álcool-Ácido Resistente (*Ziehl-Neelsen*)

Algumas bactérias não podem ser distinguidas pela coloração *Gram*, não tem uma camada constituída por peptidoglicanos, mas sim uma cápsula exterior cerosa, constituída por ácidos gordos de cadeia longo (ácido micólico)<sup>46</sup>. Este ácido micólico fornece uma impermeabilidade dos organismos ao violeta de cristal, sendo necessário outro tipo de coloração para a identificação, a coloração *Ziehl-Neelsen*. Neste procedimento as bactérias são tingidas de vermelho ficando assim em contraste com as restantes, uma vez que estas estão descoloradas e em seguida coradas com o azul-metileno, um corante de contraste<sup>45</sup>. O principal grupo de microrganismos identificados por esta coloração é *Mycobacterium spp.*

#### 4.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura são selecionados para promover as condições necessárias para o crescimento microbiano, sendo alguns específicos para determinadas características<sup>46</sup>. Existem vários tipos de culturas para diferentes exigências metabólicas:

- Não-seletivos: meio que favorece o crescimento de maior parte dos microrganismos sem nenhuma exigência específica para crescimento.
- Seletivos: meio que apenas favorece o crescimento de alguns microrganismos específicos, inibindo os restantes.

- Diferenciais: meio que permite identificação através de determinadas características exibidas pelas colônias existentes na cultura.

Os meios podem ser separados em duas categorias dependendo da sua consistência: os meios líquidos e os meios sólidos. Os primeiros destinam-se a um crescimento exponencial dos microrganismos levando a uma turvação do meio<sup>46</sup>. Os meios sólidos utilizam-se para isolamento de colônias obtendo-se no fim uma cultura pura<sup>46</sup>.

#### 4.2.1. Meios Líquidos

Tabela 12- Meios de cultura líquidos utilizados no Laboratório de Microbiologia do CHUCB.

Meio	Categoria	Características	Microrganismo
<b>Caldo de Carne</b> <sup>47</sup>	Não Seletivo	Fonte de Carbono, dextrose, vitaminas, partículas de carne e cloreto de sódio	Diferenciação de <i>Clostridium spp.</i> e crescimento de maior parte dos anaeróbios
<b>Todd-Hewitt</b> <sup>48</sup>	Seletivo	Gentamicina, ácido nalidíxico, peptonas, dextrose, cloreto de sódio, fosfato de sódio e carbonato de Sódio	Crescimento de <i>Streptococcus</i> do grupo B
<b>Tetrationato</b> <sup>49</sup>	Seletivo	Nitrogénio, vitaminas, carbono, sais biliares, tiosulfato de sódio e carbonato de cálcio	Crescimento de <i>Salmonella spp.</i>
<b>Lownstein-Jensen (semi-sólido)</b> <sup>50</sup>	Seletivo	Sais, ovos, glicerol, farinha de batata e verde malaquita	Crescimento e Isolamento de <i>Mycobacterium spp.</i>

#### 4.2.2. Meios Sólidos

Tabela 13- Meios de cultura sólidos *in vitro* utilizados no laboratório de microbiologia do CHUCB.

Meio	Categoria	Características	Microrganismo
<b>Gelose sangue</b> <sup>51</sup>	Diferencial e Não-Seletivo	Agar Columbia com 5% sangue de carneiro e mistura de peptonas	Isolamento de microrganismos fastidiosos e detecção de hemólise
<b>Gelose sangue CNA</b> <sup>52</sup>	Seletivo	Ácido nalidíxico, colistina (inibidores de gram-negativas) e sangue de carneiro (5%)	Isolamento de <i>Gram-Positivas</i>

<b>Gelose MacConkey</b> <sup>52</sup>	Diferencial e Seletivo	Cristal violeta e sais biliares (inibidor de gram-positivas)	Isolamento de <i>Gram-</i> Negativas e diferenciação de bactérias fermentadoras e não- fermentadoras de lactose
<b>Gelose chocolate Haemophilus (HAE)</b> <sup>52</sup>	Seletivo	Factor X (hemina) e V (dinucleótido de nicotinamida e adenina) e bacitricina	Isolamento de <i>Haemophilus spp.</i>
<b>Gelose chocolate + PoliVitex (PVX)</b> <sup>53</sup>	Diferencial e Não- Seletivo	Factor X e V	Isolamento de bactérias fastidiosas ( <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus spp. e</i> <i>S. pneumoniae</i> )
<b>Gelose Chocolate PolyVitex VCAT3</b> <sup>52</sup>	Seletivo	Vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim	Isolamento de <i>N.</i> <i>gonorrhoeae</i> e <i>N.</i> <i>meningitidis</i>
<b>Gelose SS</b> <sup>52</sup>	Diferencial e Seletivo	Verde brilhante, sais biliares, tiosulfato de sódio, lactose e citrato férico	Isolamento de <i>Salmonella e Shigella</i> e diferenciação de bactérias fermentadores de lactose e redutoras de sulfatos
<b>Gelose Yersinia</b> <sup>52</sup>	Diferencial e Seletivo	Manitol, vermelho neutro, cristal violeta, desoxicolato de sódio, cefsulodina, Irgasan® e novobiocina	Isolamento de <i>Yersinia spp.</i>
<b>Gelose Campylobacter</b> <sup>54</sup>	Seletivo	Sangue de carneiro (10%), peptonas, dextrose, anfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprim e vancomicina	Isolamento de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>

<b>Gelose <i>Candida</i></b> <sup>52</sup>	Diferencial e Seletivo	Hexosaminidase, substratos cromogéneos e cloranfenicol	Isolamento e identificação de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i> através das diferentes cores apresentadas por cada uma
<b>Gelose <i>Sabouraud</i></b> <sup>52</sup>	Seletivo	Peptonas, glucose, cloranfenicol e gentamicina	Isolamento de leveduras, fungos e dermatófitos
<b>Gelose Manitol <i>Salgado</i></b> <sup>55</sup>	Diferencial e Seletivo	Extrato de bovino, cloreto de sódio (7,5%), manitol e vermelho de fenol	Isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i> e identificação de <i>Staphylococcus coagulase positivos</i> e <i>coagulase negativos</i> .
<b>Gelose <i>Müller-Hinton</i></b> <sup>52</sup>	Não-seletivo	Cálcio, magnésio e baixas concentrações de timina e timidina	Antibiogramas através da difusão por discos
<b>Gelose <i>Granada</i></b> <sup>52</sup>	Diferencial e Seletivo	Peptonas, glucose, piruvato, cristal violeta, colistina, metotrexano, metronidazol	Isolamento de <i>Streptococcus</i> tipo B ( <i>S. agalactiae</i> )
<b>Gelose para pesquisa de <i>MRSA (S. aureus)</i> resistente à meticilina</b> <sup>52</sup>	Diferencial e Seletivo	Cefoxitina, mistura de cromogéneos e cloreto de sódio	Deteção de <i>MRSA</i> através da cor verde das colónias

### 4.3. Tipos de Inóculos

Dependendo do tipo de amostra, os inóculos são realizados de diferentes formas. Normalmente, os meios sólidos são inoculados pela técnica de esgotamento do produto (sementeira em quadrantes), exemplificado na figura 77-A, sendo possível desta forma obter colónias isoladas<sup>56</sup>. No entanto, existem exceções, quando o produto é urina ou um lavado bronco-alveolar, este são semeados pela técnica semi-quantitativa, como se pode observar pela figura 77-B. Os cateteres são semeados por rolamento deste na

placa (técnica de *Maki*). Os meios líquidos são semeados através da adição da amostra diretamente no meio sendo necessário posterior homogeneização.

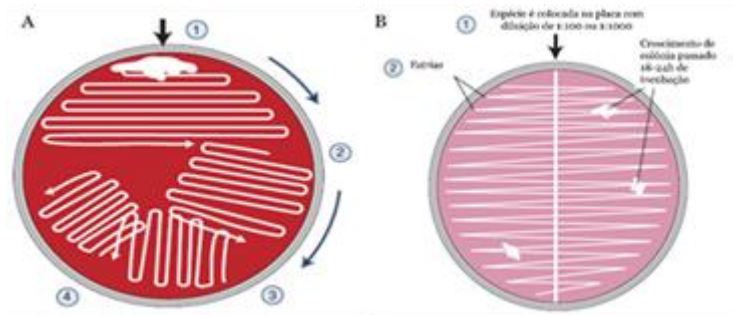


Figura 77- (A) Representação de inóculo por esgotamento. (B) Representação de inóculo para análise semi-quantitativa. Imagem adaptada de Mahon *et al*, 2014<sup>56</sup>.

## 4.4. Produtos Biológicos

### 4.4.1. Urina

Este é o produto biológico mais frequente no laboratório de microbiologia. A sua colheita é realizada em contentores próprios esterilizados após lavagem dos genitais, sendo o primeiro jato de urina rejeitado.

- **Urocultura**<sup>57</sup>: Sementeira efetuada com uma ansa calibrada de 1  $\mu$ L nos meios sólidos Gelose Sangue e Gelose *MacConkey* (18h a 24h, 35°C) pelo método semi-quantitativo. Se existir suspeita de candidíase também se semeia em Gelose *Candida* (24h a 48h, 30°C).
- **Exame Citológico**<sup>57</sup>: Após realização da urocultura uma alíquota de 10 mL é inserida no equipamento automatizado SediMax.
- **Pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (B.A.A.R.)**<sup>57</sup>: Após centrifugação da urina 10 min a 2000 rpm realiza-se um esfregaço do sedimento de urina para realização da coloração *Ziehl-Neelsen*, bem como uma alíquota para um tubo de 50 mL que irá ser enviada posteriormente para a secção de micobactérias.

- **Teste Rápido para detecção de antígenos urinários para diagnóstico de infecção por *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*<sup>58</sup>:** Para este teste é utilizado o kit *ImmuView*®, que tem com base um teste imunocromatográfico, detetando um ou os dois anticorpos existentes na linha de teste. A linha de controlo é revestida apenas por anticorpos anti-IgG.

#### 4.4.2. Fezes

As fezes são também colhidas em contentores específico e podem ter vários pedidos, como pesquisa de vírus e parasitas.

#### Coprocultura<sup>57</sup>

A sementeira é realizada por esgotamento do produto nos meios gelose *MacConkey*, gelose SS (24h, 35°C), gelose *Yersinia* (24h, 30°C), gelose *Campyloset* (48h, 42°C, em atmosfera de microaerofilia) e meio líquido de Tetracionato com lugol (6h, 35°C), sendo depois semeado em gelose SS (24h, 35°C). Para fezes de crianças com idade igual ou inferior a 5 anos é também realizada sementeira em gelose *E. coli* (O:157) durante 24h a 35°C.

#### Testes Rápidos Parasitológicos

- **StorAX SAF**®<sup>59</sup>: Kit de concentração de amostra para posterior análise microscópica. Com este kit é possível detetar larvas, ovos de helmintas e cistos ou oocistos de protozoários.
- **Rapid-VIDITEST *Crypto-Giardia***®<sup>60</sup>: É um teste rápido para pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* através de um imunoensaio cromatográfico em que os antígenos de *Cryptosporidium* e *Giardia* são detetados. A amostra reage com os anticorpos anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* fixados na linha de teste.

#### Testes Rápidos para pesquisa de vírus

- **CerTest Rotavírus e Adenovírus**<sup>61</sup>: Para realização do teste rápido é necessário recolher um pouco da amostra com a ansa já inserida no kit. A amostra de seguida é colocada no tubo coletor com o tampão de extração. Por último, coloca-se 4 gotas da mistura no poço A e no poço B (cada um para o respetivo vírus), lendo-se o resultado após 10 minutos.

- **RIDA®QUICK Norovírus<sup>62</sup>**: O Norovírus é uma das principais causas de gastroenterite em todo o mundo. Quando a amostra é positiva para Norovírus os anticorpos anti-Norovírus biotinilados formam complexos imunocomplexos com os antígenos presentes na amostra. A linha de teste, marcada com estreptavidina liga-se aos imunocomplexos através da biotina, aparecendo desta forma uma coloração vermelha na linha T.

### Testes rápidos para pesquisa bacteriana

- ***C. diff* QUIK CHEK Complete®<sup>63</sup>**: Teste rápido para deteção do antígeno do *C. difficile*, glutamato desidrogenase (GDH) e ainda para as toxinas A e B. Esta bactéria desenvolve-se em ambiente hospitalar devido a alterações da flora intestinal após tratamento com antibióticos.
- ***Pylori-Strip*<sup>64</sup>**: Teste rápido para deteção da bactéria *Helicobacter pylori*. Esta bactéria é uma das principais causas de gastrite crónica e úlcera, alojando-se no estômago. Este teste rápido consiste na ligação de anticorpos anti-*Helicobacter pylori* com os antígenos presentes na amostra.

### Teste rápido para pesquisa de sangue oculto<sup>65</sup>

Existem várias causas para a existência de sangue oculto nas fezes, como por exemplo, cancro do colón, úlceras, pólipos e fissuras. Este teste é um imunoensaio cromatográfico para deteção de hemorragias causadas pelas doenças anteriormente referidas. A técnica deste teste baseia-se na ligação de anticorpos anti-hemoglobina presente na linha de teste com a hemoglobina presente na amostra.

## 4.4.3. Aparelho Respiratório

### 4.4.3.1. Expetorações e Secreções Brônquicas<sup>21</sup>

Para estas amostras, o primeiro passo é a realização de lâminas para as colorações *Gram* e *Ziehl-Neelsen*. Para amostras produtivas, ou seja, muitos leucócitos e poucas células epiteliais, procede-se à realização da sementeira. O produto é semeado em gelose Sangue (24h, 35°C, em atmosfera de CO<sub>2</sub>), gelose HAE e gelose *MacConkey* (24h, 35°C) e em casos de doentes internados na unidade de cuidados intensivos (UCI), também em gelose *Candida* e gelose *Sabouraud* (24h, 30°C).

Quando é pedido exame cultural de B.A.A.R., separa-se a amostra para um tubo de centrífuga de 50 mL que depois é enviado para a secção de micobactérias.

#### **4.4.3.2. Aspirado Brônquico e Lavado Bronco-Alveolar (LBA)<sup>21</sup>**

Relativamente aos aspirados, estes são processados da mesma forma que as secreções e expetorações, sendo a única diferença a necessidade de concentrar a amostra (centrifugação 2000 rpm, 10 minutos).

Os LBA, para a sementeira usa-se uma ansa de 10 µL em gelose PVX (24h, 35°C, atmosfera de CO<sub>2</sub>). Após semeado, é necessário centrifugar a amostra (2000 rpm, 10 minutos) para realização das lâminas. A lâmina de coloração *Gram* é processada normalmente enquanto a lâmina para coloração *Ziehl-Neelsen* é processada por citocentrifugação.

#### **4.4.4. Hemoculturas<sup>22, 66</sup>**

A colheita das hemoculturas é realizada para frascos apropriados, sendo que a pele e zona do frasco onde a amostra é inserida devem ser desinfetados com uma solução antisséptica. Para cada paciente são colhidas quatro garrafas (duas por braço), duas garrafas de aerobiose e duas garrafas de anaerobiose. Para cada frasco deverá ser colhido aproximadamente 10 mL de sangue. As garrafas de hemocultura são incubadas no aparelho BACT/ALERT® 3D (BioMérieux) que identifica a presença de bactérias ou leveduras através da alteração da cor do indicador presente no fundo da garrafa, devido ao aumento do CO<sub>2</sub> produzido pelos microrganismos. Quando uma garrafa positivar, é necessário semeá-la. No caso de hemoculturas aeróbias, a sementeira é efetuada por quadrantes em gelose Sangue (24h, 35°C, atmosfera de CO<sub>2</sub>) e em gelose *MacConkey* (24h, 35°C). Se for uma garrafa anaeróbia, então a sementeira será em gelose PVX (24h, 35°C, atmosfera de CO<sub>2</sub>) e em gelose Sangue (48h, 35°C, atmosfera de anaerobiose). Para todas as hemoculturas é necessário também a preparação de um esfregaço para coloração *Gram*. É muito importante que todo o processo de exame cultural e citológico, seja em ambiente asséptico, devendo existir cuidado especial na desinfecção da garrafa antes de transferir a amostra para os meios, de modo a evitar contaminações.

#### **4.4.5. Catéter<sup>21</sup>**

Os cateteres são uma fonte de infeção, podendo constituir graves problemas para o paciente. Para evitar/controlar estas infeções, os catéteres são enviados regularmente para o laboratório em frasco estéril para realização de um exame cultural. A sementeira

é realizada através da técnica semi-quantitativa de *Maki*. O cateter deve chegar ao laboratório sempre acompanhado de duas garrafas de hemocultura (1 aeróbia e 1 anaeróbia). Caso não se verifique, a amostra é rejeitada.

#### **4.4.6. Exsudado Vaginal e Uretral<sup>45</sup>**

Este exame pesquisa a presença de *Trichomonas vaginalis*. A amostra deve ser processada o mais rápido possível, ou então conservada a 35°C. Os meios utilizados são gelose Sangue, gelose chocolate *PolyVitek VCAT3* (ambos incubam durante 48h, 35°C e em atmosfera de CO<sub>2</sub>) e gelose *Candida* (48h, 30°C). Podemos ainda efetuar uma pesquisa de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*.

#### **4.4.7. Exsudado Nasal<sup>57</sup>**

Teste para pesquisa de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA). A sementeira é realizada no meio gelose MRSA (meio cromogéneo) por quadrantes, incubando durante 24h, a 35°C. A zaragatoa é depois colocada em meio líquido *Todd-Hewitt* que após incubação de 24h a 35°C é repicado para gelose MRSA (24h, 35°C). A pesquisa de *S. aureus* também pode ser por PCR, dependendo do pedido.

#### **4.4.8. Outros Produtos em Zaragatoa**

##### **Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*<sup>45,57</sup>**

A bactéria gram-positiva *S. agalactiae* é uma das maiores causas de infeção neonatal. Por este motivo, a pesquisa desta bactéria é efetuada em grávidas que estejam nas 34/35 semanas de gestação. Para o exame cultural são necessárias duas zaragatoas, uma retal e outra vaginal, sendo ambas colocadas em meio líquido *Todd-Hewitt* (24h, 35°C). Passadas as 24h de incubação, o meio líquido é repicado para gelose Granada, colocando-se uma lamela em cima do inóculo, de forma a obter anaerobiose total. Este meio fica a incubar 24h, 35°C e em atmosfera de anaerobiose.

##### **Pesquisa de *Acinetobacter baumannii*<sup>45,46</sup>**

Bactéria gram-negativa capaz de causar infeções respiratórias e urinárias em pessoas que estejam medicadas por antibióticos ou a recuperar de cirurgia. A pesquisa é realizada através de uma zaragatoa retal, em que o exame cultural é realizado por quadrantes em gelose *MacConkey* e caldo de carne (24h, 35°C). Se a cultura for

negativa, então é necessário repicar o caldo de carne para gelose *MacConkey* (24h, 35°C).

#### **4.4.9. Líquidos Biológicos**

Os líquidos biológicos, independentemente da origem, são fluidos normalmente estéreis, portanto a presença de algum tipo de bactéria é preocupante. São preparadas lâminas para as colorações *Gram* e *Ziehl-Neelsen*.

##### **4.4.9.1. Líquido Pleural e Ascítico<sup>57</sup>**

Exame cultural em gelose sangue (24h, 35°C, atmosfera CO<sub>2</sub>), gelose *MacConkey*, gelose HAE (24h, 35°C) e 1-3 mL em garrafa de hemocultura pediátrica. Se não for possível, colocar umas gotas em caldo de carne (24h a 48h, 35°C).

##### **4.4.9.2. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)<sup>57</sup>**

O LCR deverá ser processado o mais rápido possível depois da colheita. O exame citológico é realizado em câmara de contagem *Nageotte*. O exame cultural é realizado em gelose Sangue, gelose PVX (ambas em atmosfera de CO<sub>2</sub>, 24 a 48h, 35°C), gelose *MacConkey* (24 a 48h, 35°C) e gelose *Sabouraud* (48h, 30°C). Semelhante aos outros líquidos biológicos, é também semeado em garrafa de hemocultura pediátrica ou então em caldo de carne (24 a 48h, 35°C), caso não seja possível recolher o volume necessário. O LCR é ainda semeado em meio líquido *Lowenstein* para exame cultural de B.A.A.R..

##### **4.4.10. Pús<sup>57</sup>**

Esta amostra pode chegar de três formas ao laboratório: em meio *portagerm*, em zaragatoa, ou então em contentor estéril. Quando o produto é recebido em *portagerm* (meio que mantém a viabilidade bacteriana durante 24h), é necessário verificar se a anaerobiose se mantém. Isto é possível através de um indicador presente no meio, que fica azul em caso de contacto com oxigénio. Caso exista contaminação por O<sub>2</sub>, então não se realiza estudo anaeróbio (o mesmo se verifica quando a amostra é recebida em contentor estéril).

##### **4.4.11. Biópsia<sup>57</sup>**

A amostra recebida, antes de ser semeada, tem de ser reduzida em pequenas porções com ajuda de um bisturi estéril. De seguida, o exame cultural é realizado em gelose

Sangue (atmosfera CO<sub>2</sub>, 24 a 48h, 35°C), gelose *MacConkey* e caldo de carne (24 a 48h, 35°C). Para o exame microscópico efetua-se dois esfregaços para coloração *Gram* e *Ziehl-Neelsen*.

## **4.5. Testes de Identificação e de Sensibilidade aos Antibióticos**

### **4.5.1. Testes Manuais**

#### **Teste da Catalase<sup>45</sup>**

A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Um microrganismo é positivo para a catalase quando se observa efervescência, devido à libertação de O<sub>2</sub>, durante a realização do teste.

Este teste permite distinguir *Streptococcus spp.* (catalase negativo) de *Staphylococcus spp.* (catalase positivo).

#### **Teste da Coagulase<sup>46</sup>**

Quando a coagulase (enzima que provoca coágulos) está presente, o fibrinogénio existente irá causar agregação da bactéria.

O teste da coagulase serve apenas para identificar o grupo *Staphylococcus*, ou seja, só se realiza se o teste da catalase for positivo. Quando a coagulase é positiva, então significa que estamos perante um *S. aureus*.

#### **Tipagem de *Streptococcus β*-hemolíticos<sup>67</sup>**

Utiliza-se um kit, Remel™ PathoDextra™ Strep Grouping (ThermoFisher), para deteção de *Streptococcus β*-hemolíticos através da classificação de *Lancefield*. Este kit irá detetar antígenos específicos presentes na cultura.

### **Teste da Oxidase<sup>45</sup>**

Este teste determina a presença da enzima citocromo C oxidase. Teste realizado apenas para bactérias *Gram*-negativas e permite diferenciar *Pseudomonas spp.* (oxidase positiva) das restantes bactérias oxidase negativas.

### **Teste do Fatores X e V<sup>45</sup>**

Teste que permite identificar *Haemophilus spp.*. Para este teste utilizam-se três discos diferentes, o primeiro contém o fator X (heme), o segundo o fator V (dinucleótido adenina-nicotinamida) e o terceiro que contém os dois. Se houver crescimento de colônias apenas em redor do disco XV estamos perante *H. influenzae*, se houver crescimento em redor dos discos XV e V, então será *H. parainfluenzae*.

### **Teste de Inibição à Bacitracina<sup>46</sup>**

A bacitracina é um antibiótico eficaz para tratamento de *S. pyogenes*, uma bactéria beta-hemolítica do grupo A, no entanto, não tem qualquer efeito em mais nenhuma bactéria beta-hemolítica.

### **Teste de Resistência à Novobiocina<sup>45</sup>**

Este antibiótico permite-nos diferenciar *S. epidermidis*, sensível à novobiocina, de *S. saprophyticus* (resistente).

### **Teste da Optoquina<sup>45</sup>**

Utiliza-se este antibiótico para se identificar *S. pneumoniae*, dado que é o único *Streptococcus* sensível.

## **4.5.2. Testes Automáticos**

O principal objetivo do laboratório de microbiologia é a identificação de microrganismos. Para este objetivo ser cumprido de uma forma mais rápida e eficaz, o laboratório de microbiologia possui um equipamento automatizado, o ID/AST VITEK® 2 COMPACT, *BioMérieux*. Este equipamento identifica os microrganismos presentes numa determinada cultura pura, através de características bioquímicas já conhecidas, realizando também antibiogramas com o objetivo de detetar sensibilidades

e resistências destes microrganismos a certos antibióticos, resultando numa terapêutica mais eficaz para o paciente.

## **4.6. Testes Serológicos**

Os testes serológicos são importantes pois detetam a presença de certos microrganismos em amostras de soro. No laboratório de microbiologia efetuam-se três tipos de serologias.

### **4.6.1. Teste Rosa Bengala<sup>45,57</sup>**

Teste realizado para pesquisa de *Brucella spp.* através de aglutinação. Esta bactéria é um bacilo *gram*-negativo prejudicial para a saúde pois poderá causar infeções crónicas. Pode ser contraída através da ingestão de alimentos contaminados. Apesar de este ser um teste muito sensível, caso seja positivo, é necessário realizar outro teste, o teste *Widal-Wright*.

### **4.6.2. Teste Widal-Wright<sup>45,57</sup>**

Teste para identificação de antigénios febris. Consiste na aglutinação de anticorpos quando estes entram em contacto com antigénios do tipo O (somático) ou de antigénios tipo H (flagelar). Com este teste é possível detetar brucelose (infeção por *Brucella spp.*) e também infeção por *Salmonella spp.* Existem diferenças entre eles, sendo que quando é uma infeção por *Salmonella spp.* existe ligação anticorpo-antigénio O e H, enquanto na infeção por *Brucella spp.*, apenas ocorre reação com antigénio O.

### **4.6.3. VDRL e RPR (*rapid plasma reagin*)<sup>46,57</sup>**

Testes realizados para diagnóstico da Sífilis. A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada pela *Treponema pallidum*. Os dois testes mais conhecidos são o RPR (*rapid plasma reagin*) e o VDRL (teste equivalente ao RPR, mas para pesquisa de neuro-sífilis no LCR). O procedimento do teste é baseado na reação antigénio-anticorpo, em que ocorre uma aglutinação entre o antigénio cardiolíplina com o anticorpo reagina presente nos indivíduos positivos.

## 4.7. Testes de Biologia Molecular

Os testes de biologia molecular são realizados através do equipamento GeneXpert®. Este equipamento utiliza a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR). Resumidamente, o que o equipamento faz é uma extração do RNA existente na amostra, transcrição do RNA em DNA através da enzima transcriptase reversa, amplificação da cadeia de DNA e detecção da sequência-alvo<sup>68</sup>. Para processar a amostra basta misturá-la com o tampão de inativação. De seguida, uma certa quantidade de amostra já misturada com o tampão é pipetada para dentro do cartuxo (dependendo do tipo de amostra, a quantidade a pipetar pode mudar). Para finalizar basta introduzir o cartuxo no equipamento, identificando o código de barras do paciente e do cartuxo (identificação do teste a ser realizado) e esperar pelo resultado<sup>69</sup>.

### 4.7.1. Detecção de *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina<sup>70</sup>

Teste identificado por Xpert® MTB/RIF. A *M. tuberculosis* afeta milhões de pessoas em todo o mundo caracterizando-se por ser extremamente contagiosa. O tratamento da tuberculose pode envolver a administração de vários fármacos como isoniazida, rifampicina, pirazinamida. No entanto, as várias estirpes que existem podem ganhar resistência a um ou a mais fármacos. O teste existente de Xpert tem como objetivos, identificar o DNA de *M. tuberculosis* em expetorações e detetar mutações do gene rpoB que confere resistência ao antibiótico rifampicina.

### 4.7.2. Detecção de bactérias Gram-Negativas não suscetíveis a carbapenemos<sup>45,71</sup>

Bactérias como *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* são produtoras de carbapenemases, e desta forma, resistentes a todos os agentes beta-lactâmicos e a diversas classes de antibióticos. O kit identificado como Xpert® Carba-R é um teste para deteção e diferenciação de vários genes associados à não-sensibilidade a carbapenemos: blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaOXA-48 e blaIMP-1.

### 4.7.3. Detecção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)<sup>72</sup>

Normalmente, para terapêutica de *S. aureus* é administrado meticilina, uma penicilina sintética. No entanto, ao longo dos anos, esta bactéria foi adquirindo alguns mecanismos de proteção através da aquisição do gene mecA ou mecC no genoma. O

ensaio Xpert MRSA foi desenhado para uma deteção rápida de MRSA em zaragatoas nasais em pacientes com risco de colonização nasal.

#### **4.7.4. Deteção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae***<sup>45-73</sup>

As bactérias *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* são bactérias gram-negativas e ambas estão associadas a doenças sexualmente transmissíveis. Através do ensaio Xpert CT/NG é possível detetar e diferenciar *C. trachomatis* de *N. gonorrhoeae* de amostras de indivíduos assintomáticos e sintomáticos. As amostras podem ser variadas (urina, zaragatoa endocervical e zaragatoa vaginal).

## 5. Laboratório de Hematologia

O laboratório de hematologia do CHUCB estuda as células sanguíneas e os fatores de coagulação, de forma a diagnosticar patologias associadas ao sangue, como por exemplo, doenças oncológicas, anemias, patologias associadas às proteínas de coagulação e ainda patologias plaquetares.

### 5.1. Análise Microscópica

A análise ao microscópio tem como objetivo observar características celulares específicas de certas patologias hematológicas.

Para a realização do esfregaço, o primeiro passo é a colocação de uma pequena gota de sangue numa lâmina. De seguida, com a ajuda de uma lamela, e num ângulo de 45°, esta gota é espalhada pela superfície da lâmina de forma a ser produzida uma camada fina de células.

#### 5.1.1. Técnicas de Coloração

##### 5.1.1.1. Coloração *May-Grunwald/Giemsa*<sup>46,74</sup>

A coloração *May-Grunwald/Giemsa* destina-se à coloração de células do sangue periférico e baseia-se na aplicação sucessiva de dois corantes diferentes. O corante de *May-Grunwald* contém eosina e azul de metileno, que por reações químicas se transformam em eosinato de azul-metileno. Este composto cora os núcleos a azul e o citoplasma a vermelho-rosa. O corante *Giemsa* tem como objetivo aumentar a intensidade da coloração bem como de evidenciar de forma mais nítida os elementos celulares.

Para a realização desta coloração, no laboratório de hematologia, existe um equipamento, o Aerospray® Pro Hematology Slide Stainer (EliTech) que permite uma coloração mais rápida e eficiente das lâminas.

##### 5.1.1.2. Coloração de *Perls*<sup>46,74</sup>

A coloração de *Perls* tem como objetivo a identificação dos depósitos férricos na medula óssea. Desta forma, é possível identificar a sua sobrecarga deste ião, alterações

na sua utilização ou a carência de ferro. Esta coloração baseia-se na reação do azul de prússia com o ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) do grupo heme. Este ferro irá reagir em solução de ácido clorídrico com hexacianoferrato (II) de potássio e desta forma precipita sob a forma de complexo insolúvel. Este precipitado corresponde ao ferro férrico (livre) existente na amostra, que adquire assim uma coloração azul.

### **5.1.1.3. Teste de Falciformação<sup>46,74</sup>**

O teste da Falciformação contribui para uma confirmação de anemia falciforme. Esta anemia caracteriza-se pela forma de foice dos eritrócitos. Ocorre devido a uma troca de aminoácido (ácido glutâmico para valina) no cromossoma 11, originando uma hemoglobina defeituosa. O primeiro passo deste teste é a adição de metabissulfito de sódio a 2% ao sangue. Este passo é crucial pois os eritrócitos estão sob baixas concentrações de  $\text{O}_2$ , permitindo assim que estes tomem a forma de foice. De seguida é colocada uma lamela, sob a lâmina e vedada por parafina. A lâmina vedada é incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Após o tempo de incubação, observa-se a lâmina ao microscópio.

## **5.2. Hemograma**

O hemograma é um exame do sangue em que se avalia os três principais grupos celulares: leucócitos, eritrócitos e plaquetas. estes três grandes grupos são descendentes da mesma célula progenitora, uma célula estaminal pluripotente existente na medula, que depois cresce e se diferencia em células mais específicas<sup>1</sup>. Este processo de crescimento e diferenciação é denominado de hematopoiese<sup>1</sup>.

### **5.2.1. Metodologia**

O CHUCB tem um equipamento automatizado para realização de hemogramas através do equipamento *UniCel DxH 800®* Analisador Hematológico (*Beckman Coulter*). Este equipamento permite uma análise quantitativa e autónoma de parâmetros hematológicos a partir de amostras de sangue total através do seu sistema de dispersão de luz, emitida por um laser Hélio-Neón, e do seu sistema de deteção constituído por 2 detetores óticos e uma leitura de 5 ângulos distintos<sup>75</sup>. Desta forma, é possível uma análise diferencial de componentes celulares através do volume, tamanho e ainda complexidade celular. A análise para a contagem das células sanguíneas (CBC) e a análise das células sanguíneas nucleadas (NRBC) é realizada através da mesma metodologia, o método de *Coulter*. O equipamento fornece também parâmetros reticulocitários.

### **5.2.2. Eritrograma<sup>76</sup>**

O Eritrograma avalia o eritrócito, este é uma célula de grande importância fisiológica pois transporta o oxigênio dos pulmões para os tecidos. Como esta função é exercida pela hemoglobina presente no eritrócito, a insuficiência eritrocitária é definida como uma diminuição da hemoglobina sanguínea, sendo a patologia associada caracterizada de anemia. Desta forma, a diminuição da hemoglobina costuma acompanhar-se de uma eritrocitopenia (diminuição de eritrócitos).

Como parâmetros de um eritrograma completo temos: a contagem de eritrócitos, hematócrito (volume de massa eritroide), concentração de hemoglobina, VCM, RDW, hemoglobina corpuscular média e concentração hemoglobínica corpuscular média.

### **5.2.3. Leucograma<sup>76</sup>**

O leucograma estuda os leucócitos, fazem parte os seguintes parâmetros: contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

As diferentes populações leucocitárias são determinadas pelas suas características óticas e divididas de acordo com a sua complexidade e tamanho celular. A partir de um cálculo matemático em função do número total de leucócitos, estas populações são determinadas quantitativamente.

### **5.2.4. Plaquetograma<sup>76</sup>**

Fração do hemograma correspondente à contagem de plaquetas. O equipamento faz a contagem e medição destas pelo mesmo canal de contagem dos eritrócitos, diferenciando-as por volumes. Durante a contagem de plaquetas, o equipamento fornece um parâmetro extra: volume plaquetário médio (VPM).

## **5.3. Pesquisa de Hemoglobina Glicada, A<sub>2</sub> e Fetal<sup>1,77</sup>**

A deteção de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) é muito importante pois é ela que nos dá informação sobre o estado glicémico do organismo. Isto é possível, pois o eritrócito durante os seus 120 dias de vida vai incorporando a glicose existente na circulação. Desta forma, a hemoglobina glicada (com glicose incorporada) é uma análise muito requerida para diagnóstico e controlo glicémico, principalmente em doentes com diabetes *mellitus*.

Este tipo de análise é realizado pelo equipamento automatizado ADAMS™ A1c HA-8180T, ARKRAY em amostras de sangue-EDTA. Este utiliza uma coluna cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC) em que a técnica de medição baseia-se numa troca aniônica de fase reversa. O processamento da amostra pode ser dividido em três fase principais: hemólise, separação e detecção. A hemoglobina na primeira fase vai ser separada devido à sua carga positiva que irá interagir com a carga negativa da matriz, sendo depois hemolisadas e injetadas na coluna. As moléculas serão posteriormente eluídas com um tampão com diferentes forças iônicas. Estas forças iônicas irão proporcionar uma eluição faseada das diferentes frações de hemoglobina, sendo depois detetadas por método colorimétrico. Com este equipamento é também possível a detecção hemoglobina fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e hemoglobina A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) ambas utilizadas por exemplo, para o diagnóstico de  $\beta$ -talassemia e ainda a  $\beta$ -hemoglobina S (HBs), resultando neste caso em uma anemia falciforme.

#### **5.4. Velocidade de Sedimentação**<sup>78,79</sup>

A velocidade de sedimentação (VS) é um marcador não específico para diagnóstico de inflamações, gamopatias monoclonais e doenças autoimunes, como por exemplo, artrites, podendo estar também associado a outras patologias. O valor da VS pode também estar alterado devido à idade do paciente. Este teste baseia-se na capacidade de sedimentação eritrocitária quando o sangue venoso é colocado na vertical, em um tubo de citrato de sódio numa proporção de 1:9. A velocidade de sedimentação pode ser definida como a distância (milímetros) entre a superfície líquida do plasma e a superfície de sedimentação dos eritrócitos. A taxa de sedimentação sob a influência da gravidade é determinada após 1h. Para este teste a secção de hematologia possui um equipamento automatizado, o Sediplus® S 2000, DESAGA que efetua uma medição através de transmissão infravermelha aos 0 minutos, aos 30 minutos e aos 60 minutos. O resultado será a diferença de altura durante os 60 minutos, entre o menisco do plasma e a superfície de sedimentação dos eritrócitos.

#### **5.5. Hemóstase**

A hemóstase é o processo fisiológico responsável por limitar a perda sanguínea em caso de lesão vascular<sup>1</sup>. Este processo rápido, localizado e bem regulado está dividido em três fases principais (primária, secundária e terciária), existindo três sistemas de proteínas

(plaquetas, fatores de coagulação e fatores fibrinolíticos) responsáveis pelo equilíbrio entre mecanismos coagulantes e anticoagulantes.

### **5.5.1. Hemóstase Primária**<sup>1,46</sup>

A primeira fase do processo de hemóstase baseia-se na atividade plaquetar. Após a lesão vascular, as plaquetas são as primeiras células a alcançar a lesão, iniciando assim o processo hemostático. A principal função destas é a criação de um tampão mecânico de forma a impedir um vazamento de sangue. Este processo ocorre devido à exposição, após lesão, do colagénio que irá servir de mediador de ligação do fator *von Willebrand* (VWF). As plaquetas, por sua vez, irão ligar-se a este fator, aderindo desta forma ao tecido subendotelial exposto. Nas lesões também ocorre libertação de epinefrina e ADP para o sangue, ativando também mais plaquetas e permitindo a agregação destas.

Para estudo de disfunções plaquetares, o laboratório possui um sistema PFA, Siemens Healthineers que simula *in vitro* o processo de adesão e agregação plaquetar<sup>80</sup>. Este equipamento aspira o sangue colhido em citrato através de um capilar, expondo assim as plaquetas a condições de elevado fluxo<sup>80</sup>. Em seguida, as plaquetas entram em contacto com uma membrana revestida de colágeno, epinefrina e ADP, ativando a função plaquetar<sup>80</sup>. Devido ao processo de adesão e agregação das plaquetas, um coágulo será formado no capilar, diminuindo desta forma o fluxo de sangue aspirado gradualmente, até parar. Estes agregados plaquetares (coágulos) irão ser detetados pela alteração de luz transmitida<sup>80</sup>. O resultado é expresso como tempo de oclusão (intervalo de tempo desde o início do teste até à formação do coágulo, em segundos).

### **5.5.2. Hemóstase Secundária**<sup>46,78</sup>

A hemóstase secundária é a parte do processo onde ocorre coagulação sanguínea, tendo como objetivo a transformação do coágulo inicial instável formado pelas plaquetas em um coágulo firme, definitivo e estável. A hemóstase secundária compreende um mecanismo biológico de amplificação através da ativação sequencial de proteínas: a cascata da coagulação. A cascata de coagulação está dividida em via intrínseca, extrínseca e via comum, e tem como objetivo a formação de trombina, que por sua vez, converte o fibrinogénio em fibrina. A fibrina é responsável pela conversão do coágulo formado numa forma mais estável através da sua infiltração nos agregados plaquetares.

A via extrínseca é ativada através do fator tecidual (TF) expostos na membrana ativando assim o fator VII plasmático. Para ativação da via intrínseca terá de existir ativação do fator XII através do contacto do sangue com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Este processo é denominado de ativação por contacto, e necessita ainda de outros componentes do plasma, como a calicreína e cininogênio de alto peso molecular, levando assim à ativação do fator XI. Ambas as vias irão convergir para uma via comum de forma a ativar o fator X. O objetivo da cascata de coagulação é produção de fibrina, a principal molécula do coágulo. A cascata da coagulação está representada na figura 78.

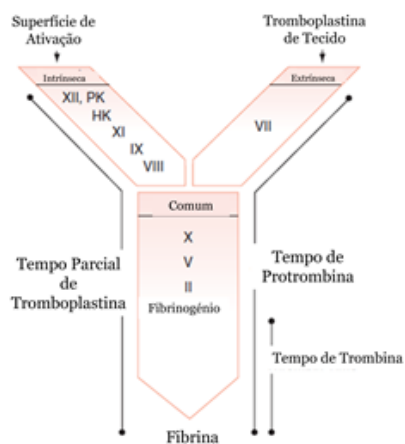


Figura 78- Imagem representativa da cascata de coagulação<sup>1</sup>.

### 5.5.3. Fibrinólise<sup>1,46</sup>

A fibrinólise é a última fase da resposta hemostática, em que a fibrina existente no coágulo será eliminada enzimaticamente de forma a evitar um evento trombótico. Contém três etapas principais: a produção de plasminogênio, a transformação do plasminogênio em plasmina pela enzima estreptoquinase e a degradação da fibrina pela plasmina. Esta quebra irá originar produtos de degradação da fibrina (FDPs). Também poderá existir formação de produtos insolúveis (D-dímeros), caso o coágulo já tenha sido estabilizado pelo fator XIII.

### 5.5.4. Testes de função hemostática<sup>81,82</sup>

São quatro os principais ensaios diários realizados no laboratório para avaliação da hemóstase:

- **Tempo de protrombina:** tempo de coagulação do plasma na presença de tromboplastina. Avalia a via extrínseca da coagulação.
- **Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada:** tempo de coagulação após ativação dos fatores de contacto, avaliando assim, a via intrínseca.
- **D-dímeros:** teste utilizado para avaliação dos produtos resultantes da fibrinólise.
- **Fibrinogénio C:** Avalia a conversão de fibrinogénio em fibrina. Pode estar aumentado em processos inflamatórios e gravidez.

Existem outros testes realizados, no entanto menos frequentes, como o doseamento dos fatores da coagulação ou doseamento dos inibidores da coagulação. Como inibidores da coagulação temos a proteína C, a proteína S, a antitrombina e ainda o anticoagulante lúpico (AL). É também realizado o ensaio para deteção do VWF para diagnóstico da doença de *von Willebrand*. Estes ensaios são todos efetuados pelo mesmo equipamento, o ACL TOP, Werfen que utiliza três métodos de deteção: colorimétrico, turbidimétrico e imunoensaio.

## 5.6. Testes de Biologia Molecular

### 5.6.1. Teste Xpert® HemosIL FII & FV<sup>83</sup>

Ensaio realizado com testes Gene *Xpert* para deteção de mutações do fator II (protrombina) e do fator V de *Leiden* em sangue citrado. Ambos os fatores, quando mutados, estão associados a um aumento de trombozes venosas.

A mutação do fator II deriva de uma transição de guanina para adenina no nucleótido 20210. Devido a esta mutação, os níveis plasmáticos de protrombina aumentam.

Relativamente ao fator V de *Leiden*, a mutação resulta numa substituição do aminoácido arginina para glutamina no nucleótido 1691. Esta troca permite resistência à clivagem pela proteína C ativada (anticoagulante).

### 5.6.2. Teste Xpert® BCR-ABL Ultra<sup>84</sup>

Teste utilizado para detecção de transcritos mRNA de BCR-ABL1 em amostras de sangue periférico, em doentes diagnosticados com Leucemia Mielóide Crónica (LMC). O BCR-ABL representa uma translocação entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22 em que ocorre uma fusão do gene ABL1 do cromossoma 9 para a região BCR do cromossoma 22. Esta translocação dá origem ao cromossoma Philadelphia. Este cromossoma está presente em mais de 95% dos doentes LMC, sendo a sua detecção importante para o diagnóstico.

### 5.7. Citometria de Fluxo<sup>85,86</sup>

A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite uma análise de vários parâmetros a partir de uma suspensão celular. Este tipo de análise é normalmente utilizado para estudos imunológicos e estudos oncológicos e utiliza lasers como fonte de luz para produzir sinais fluorescentes, que serão detetados por fotomultiplicadores. Estes sinais são posteriormente, transformados em sinais elétricos, lidos por um computador (figura 79).

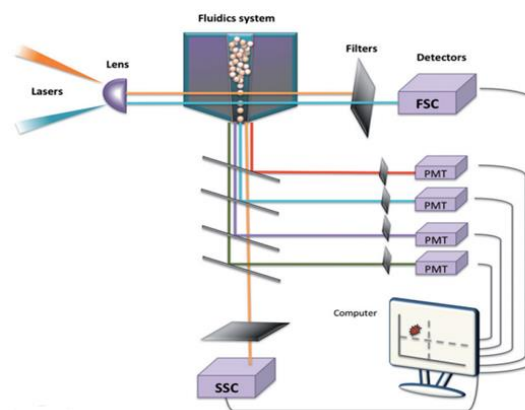


Figura 79- Representação dos componentes de um citómetro de fluxo bem como do processamento do sinal e sua detecção. Figura adaptada de Alan *et al.*, 2017<sup>85</sup>.

Na citometria de fluxo as células são alinhadas uma a uma e conduzidas até um laser. No sentido horizontal da luz podemos avaliar o tamanho celular (FSC), e num ângulo de 90° que a complexidade celular (SSC). As características fluorescentes detetadas são devido a anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos, que se vão ligar a recetores específicos celulares. O citómetro utilizado no LPC é o citómetro BD FACSCalibur™. Qualquer líquido biológico pode ser estudado por citometria de fluxo, no entanto os mais frequentes são o sangue total, lavados broncoalveolares e aspirados de medula

óssea. Dependendo do tipo de amostra e da suspeita de diagnóstico são selecionados diferentes painéis de antígenos. O estudo imunofenotípico permite o diagnóstico de patologias hemato-oncológicas: leucemias linfóides crônicas, gamopatias monoclonais, síndromes mielodisplásicas, leucemia aguda, entre outros.



## Bibliografia

1. Hoffbrand A, Moss P. *Fundamentos Em Hematologia*. Artmed Editora. Vol 59.; 2008.
2. Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine*. McGraw-Hill Education. 2018.
3. Saude DG de. Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropénia no Adulto. *Norma nº 30 da DGS*. 2015;30:1-37.
4. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC & Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *The Lancet*. 2016;387(10021):907-916.
5. DeLoughery TG. Iron Deficiency Anemia. *Med Clin North Am*. 2017;101(2):319-332.
6. Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism: Current facts and future directions. *Biochem Medica*. 2012;22(3):311-328.
7. Ning S, Zeller MP. Management of iron deficiency. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*. 2019:315-322.
8. Norton P, Araújo N, Pinho P, Gomes JC, Silva C, Gama C, Barbosa M, Ferreira P, Cunha S, Moreira S, Martins S. Diagnosis, treatment, and work impact of iron deficiency anemia in a Portuguese urban community. *Porto Biomedical Journal*. 2020:1-7.
9. Cappellini MD, Musallam KM, Taher AT. Iron deficiency anaemia revisited. *Journal of internal medicine*. 2020;287(2):153-170.
10. Bouri S, Martin J. Investigation of iron deficiency anaemia. *Clinical Medicine*. 2018:242-244.
11. Crispin P, Sinclair F, Andriolo K. Low haemoglobin density for detecting iron deficiency across a large population , including pregnancy. *International journal of laboratory hematology*. 2016:397-402.
12. Urrechaga E, Unceta M, Borque L, Escanero JF. Low hemoglobin density potential marker of iron availability. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2012;51:47-51.
13. Ng EHY, Leung JHW, Lau YS, Ma ESK. Evaluation of the new red cell parameters on Beckman Coulter DxH800 in distinguishing iron deficiency anaemia from thalassaemia trait. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(2):199-207.

14. Yildirim DG, Kaya Z. Utility of new red cell parameters for distinguishing functional iron deficiency from absolute iron deficiency in children with familial Mediterranean fever. *International journal of laboratory hematology*. 2019;293-297.
15. Dopsaj V, Martinovic J, Dopsaj M. Early detection of iron deficiency in elite athletes : could microcytic anemia factor ( Maf ) be useful?. *International journal of laboratory hematology*. 2014;37-44.
16. Lewis, SM, Bain BJ, Bates I, Dacie JV. Dacie and Lewis practical haematology. Churchill Livingstone/Elsevier, 2006.
17. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia & Analgesia*. 2018;126(5):1763-1768.
18. Ratner B. The correlation coefficient: Its values range between +1/-1, or do they?. *Journal of targeting, measurement and analysis for marketing*. 2009;17(2):139-142.
19. Fonseca C, Marques F, Robalo Nunes A, Belo A, Brilhante D, Cortez J. Prevalence of anaemia and iron deficiency in Portugal: the EMPIRE study. *Internal medicine journal*. 2016;46(4):470-478.
20. Página oficial Centro Hospitalar Cova da Beira. Laboratório de Patologia Clínica. <http://www.chcbeira.pt/?cix=729&ixf=seccao&lang=1>
21. Procedimentos Internos. Manual de Colheitas. CHUCB.
22. Procedimentos Internos. Fase pré-analítica. CHUCB.
23. Roche. Sistema pré-analítico Cobas p612. Disponível em. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas-p-512-and-cobas-p-612-pre-analytical-systems.html>
24. Faísca M. Desafios Da Acreditação Do laboratório clínico. 1º Congresso de Controlo da Qualidade Laboratorial para Países de Língua Portuguesa. 2017.
25. Procedimento Interno. Fase Analítica. CHUCB.
26. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1981;27(3):493-501.
27. Procedimentos Internos. Fase pós-analítica. CHUCB.
28. Roche. Analisador Cobas Série 8000. Manual do Operador.
29. Roche. Analisador Cobas Série 8000 c602. Bulas Elecsys.

30. Abbott. Analisador Architect i2000SR. Bulas Architect System.
31. Siemens Healthineers. Atellica NEPH 630 System. Manual do Operador.
32. ThermoFisher. ImmunoCAP 250. Bula IgE Total e Específica.
33. ThermoFisher. ImmunoCAP 250. Bula Calprotectina 2.
34. Sebia. CAPILLARYS 3 OCTA. Manual do Operador.
35. Queiroz SC , Jardim IC. Eletroforese capilar. *Rev Chemkeys*. 2018:1-9.
36. Sebia. HYDRASIS Focusing. Bula IF sérica.
37. Sebia. HYDRASIS Focusing. Bula IF Perfil Urinário.
38. Sebia. HYDRASIS Focusing. Bula IF Bence-Jones.
39. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, *et al*. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009;23(2):215-224.
40. Roche. Sistema Cobas 4800. Manual do Operador.
41. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-219.
42. Vircell. Testes de Imunofluorescência. Bula de Coxiella burneti I+II IFA IgG/IgM e Rickettsia conorii IFA IgG.
43. A. Menarini Diagnostics. SediMax e AutionMax. Manual do Operador.
44. Protocolos Internos. Testes rápidos para drogas de abuso e gravidez. CHUCB.
45. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. *Elsevier Health Sciences*. 2016.
46. McPherson RA, Msc MD, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Elsevier Health Sciences, Vol 125; 2016.
47. BD Biosciences. BBL Cooked Meat Medium.
48. BD Biosciences. BBL Tood Hewitt Broth. Disponível em <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22908>. Consultado a 19/12/2020.
49. ThermoFisher Scientific. Tetrathionate Broth. Disponível em [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0029&org=124&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0029&org=124&c=UK&lang=EN). Consultado a 19/12/2020.
50. Science Direct. Löwenstein-Jensen Medium. Disponível em

- <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/lowenstein-jensen-medium/pdf>. Consultado a 19/12/2020.
51. BD Biosciences. BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood. Disponível em <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9063>. Consultado a 19/12/2020.
  52. Biomérieux. Meios de Cultura Convencionais. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-convencionais>. Consultado a 19/12/2020.
  53. BD Biosciences. BBL Chocolate PoliVitex. Disponível em <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9063>. Consultado a 19/12/2020.
  54. BD Biosciences. BD Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics and 10% Sheep Blood. Disponível em <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9061>. Consultado 19/12/2020.
  55. BD Biosciences. BD Mannitol Salt Agar. Disponível em <https://www.bd.com/resource.aspx?id=9074>. Consultado a 19/12/2020.
  56. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Saunders. 2014.
  57. Procedimentos Internos. Microbiologia. CHUCB.
  58. SSI Diagnostica. ImmuView. Bula Urinary Antigen Test.
  59. Axonlab. Disponível em <https://ch.axonlab.com/en/medical-practice/human-medicine/microbiology/accessories-consumables/5622/storax-saf>. Consultado em 22/12/2020.
  60. Vidia. Crypto-Giardia Rapid Test. Disponível em <https://www.vidia.cz/uk/rapid-tests/diagnosis-of-gastro-intestinal-infections/rapid-viditest-crypto-giardia-card-1-detail>. Consultado em 28/12/2020.
  61. Certest. Rotavírus e Adenovírus. Disponível em <https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/02/IU-XR88V.pdf>. Consultado em 28/12/2020.
  62. R-Biopharm. RIDAQUICK Norovírus. Disponível em <https://clinical.r-biopharm.com/products/ridaquick-norovirus-2/>. Consultado em 28/12/2020.
  63. Abbott. Clostridium difficile complete. Disponível em <https://www.globalpointofcare.abbott/pt/product-details/c-diff-quick-check-complete.html>. Consultado a 28/12/2020.
  64. Coris Bioconcept. Pylori-Strip. Disponível em <https://www.bioconnections.co.uk/files/C1019-insert.pdf>. Consultado a

28/12/2020.

65. Cromatest. Fecal occult blood cassette. Disponível em <https://www.linear.es/wp-content/uploads/2018/03/4325225-FOB-25-tests-ing.pdf>. Consultado a 28/12/2020.
66. Biomérieux. BACT/ALERT 3D. Disponível em <https://www.biomerieux-industry.com/products/bact/alert-3d-rapid-microbial-detection>. Consultado a 10/01/2021.
67. ThermoFisher Scientific. Remel™ PathoDX™ Strep Grouping Kit. Disponível em <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R62025#/R62025>. Consultado a 12/01/2021.
68. Benson, Harold J. Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology. Boston: McGraw-Hill Higher Education, 2005.
69. Cepheid. Disponível em [https://www.cepheid.com/?gclid=CjwKCAiAm-2BBhANEiwAe7eyFAQ\\_6AzXZVrw1UNQkO7J875cbyPo9df7ISP\\_Cms6iLZoTJfi jLrZRoCD78QAvD\\_BwE](https://www.cepheid.com/?gclid=CjwKCAiAm-2BBhANEiwAe7eyFAQ_6AzXZVrw1UNQkO7J875cbyPo9df7ISP_Cms6iLZoTJfi jLrZRoCD78QAvD_BwE). Consultado a 22/01/2021.
70. Cepheid. Xpert® MTB/RIF. Disponível em [https://www.cepheid.com/en\\_US/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-MTB-RIF](https://www.cepheid.com/en_US/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-MTB-RIF). Consultado a 27/01/2021.
71. Cepheid. Xpert® Carba-R. Disponível em [https://www.cepheid.com/en\\_US/tests/Healthcare-Associated-Infections/Xpert-Carba-R](https://www.cepheid.com/en_US/tests/Healthcare-Associated-Infections/Xpert-Carba-R). Consultado a 05/02/2021.
72. Cepheid. Xpert® MRSA NxG. Disponível em [https://www.cepheid.com/en\\_US/tests/Healthcare-Associated-Infections/Xpert-MRSA-NxG](https://www.cepheid.com/en_US/tests/Healthcare-Associated-Infections/Xpert-MRSA-NxG). Consultado a 12/02/2021.
73. Cepheid. Xpert® CT/NG. Disponível em [https://www.cepheid.com/en\\_US/tests/Sexual-Health/Xpert-CT-NG](https://www.cepheid.com/en_US/tests/Sexual-Health/Xpert-CT-NG). Consultado a 12/02/2021.
74. Procedimentos Internos. Hematologia. CHUCB.
75. UniCel DxH 800® Analisador Hematológico, Beckman Coulter. Manual do Operador. CHUCB.
76. Failace R. *Hemograma: Manual de Interpretação*. Artmed Editora; 2015.
77. Urrechaga E. Analytical evaluation of the ADAMS<sup>(TM)</sup> A1c HA8180T analyzer for the measurement of HbA1c. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2018;32(1).

78. Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2018.
79. Sediplus® S 2000, DESAGA. Disponível em [https://dafxbb5uxjcds.cloudfront.net/fileadmin/user\\_upload/99\\_Bedienungsa nleitungen/Instruction\\_Manual\\_Sediplus\\_R\\_\\_S\\_2000\\_\\_230V\\_90.189.700.pdf](https://dafxbb5uxjcds.cloudfront.net/fileadmin/user_upload/99_Bedienungsa nleitungen/Instruction_Manual_Sediplus_R__S_2000__230V_90.189.700.pdf). Visualizado a 17/04/2021.
80. INNOVANCE® PFA-200 System, Siemens Healthineers. Disponível em <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/innovance-pfa-200>. Visualizado a 20/04/2021.
81. ACL TOP, Werfen. Bulas HemosIL®.
82. ACL TOP, Werfen. Disponível em <https://www.instrumentationlaboratory.com/en/acl-top-family-series>. Visualizado em 22/04/2021.
83. Gene Xpert, Cepheid. Teste Xpert® HemosIL FII & FV. Disponível em <https://www.cepheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert%20Factor%20II%20%26%20V%20PORTUGUESE%20Package%20Insert%20301-0590-PT%2C%20Rev.%20C.pdf>. Visualizado a 26/04/2021.
84. Gene Xpert, Cepheid. Teste Xpert® BCR-ABL Ultra. Disponível em <https://www.cepheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert%20BCR-ABL%20Ultra%20Assay-ENGLISH%20PI%20302-0738%20Rev.%20C.pdf>. Visualizado a 26/04/2021.
85. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*. 2017;37(2):163-176.
86. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*. 2018;120:5.1.1-5.1.11.