

MESTRADO

Análises Clínicas

Relatório Final de Estágio Profissional

Inês Mesquita

M

2020



MESTRADO

Análises Clínicas

MONOGRAFIA

Vacinação contra a gripe durante a gravidez

Inês Mesquita

M

2020





VACINAÇÃO CONTRA A GRIPE DURANTE A GRAVIDEZ

Inês Andreia Costa Mesquita

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Maria de São José Garcia Alexandre.

Julho, 2020

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

SUMÁRIO

A gripe, uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, é uma doença viral respiratória altamente infecciosa. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que as epidemias sazonais de gripe causem anualmente 290 000 a 650 000 mortes em todo o mundo. A vacinação sazonal contra a gripe é a maneira mais eficaz de prevenir a infecção e as complicações dela decorrentes. As recomendações da vacinação sazonal contra a gripe priorizam os grupos de riscos, onde se incluem as crianças com idade inferior a 2 anos, indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, indivíduos com doenças crônicas específicas, profissionais de saúde e mulheres grávidas. As mulheres grávidas correm um risco aumentado de hospitalização, morte e efeitos adversos na gravidez após a infecção pelo vírus da gripe. Portanto, a imunização de rotina contra a gripe é recomendada pela OMS para mulheres que estão ou estarão grávidas durante a época de gripe, podendo ser esta administrada durante qualquer trimestre da gravidez.

Palavras-chaves: gripe; gravidez; vacinação materna; eficácia vacinal; segurança vacinal.

ABSTRACT

Influenza, one of the biggest causes of morbidity and mortality worldwide, is a highly infectious respiratory viral disease. The World Health Organization (WHO) estimates that seasonal influenza epidemics annually cause 290,000 to 650,000 deaths worldwide. Seasonal flu vaccination is the most effective way to prevent infection and its complications. Recommendations for seasonal influenza vaccination prioritize risk groups, which include children under the age of 2, individuals aged 65 and over, individuals with specific chronic illnesses, healthcare professionals and pregnant women. Pregnant women are at an increased risk of hospitalization, death, and adverse effects on pregnancy after influenza virus infection. Therefore, routine immunization against influenza is recommended by WHO for women who are or will be pregnant during the flu season, which can be administered during any trimester of pregnancy.

Keywords: flu; pregnancy; maternal vaccination; vaccine efficacy; vaccine safety.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	v
Lista de figura	vii
Lista de tabelas	viii
1. Introdução	1
2. Gripe na gravidez	13
2.1. Gripe na gravidez e efeitos no feto	15
3. Vacinação contra a gripe na gravidez	17
3.1. Eficácia da vacina da gripe	20
3.2. Segurança da vacina da gripe	22
3.3. Recomendações e diretrizes a favor da imunização materna	28
3.4. Barreiras e soluções para melhorar a adesão à imunização materna	29
4. Risco de malformação fetal?	32
5. Conclusão	38
6. Referências bibliográficas	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACOG** – Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas
- ACIP** – Comité Consultivo para Práticas de Imunização
- ATAGI** - Grupo Consultivo Técnico Australiano de Imunização
- CDC** – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América
- DGS** – Direção Geral da Saúde
- ECDC** - Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças
- ECR** – Ensaio Clínicos Randomizados
- EV** – Eficácia da Vacina
- GISRS** – Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe
- HA** – Hemaglutinina
- HI** - Inibidores de Hemaglutinação
- IC95%** - Intervalo de Confiança de 95%
- IgA** – Imunoglobulina A
- IgG** – Imunoglobulina G
- IIV** – Vacina Inativa da Gripe
- IMC** – Índice de Massa Corporal
- JNC** - Centro Nacional de Saúde e Desenvolvimento Infantil do Japão
- LAIV** – Vacina Viva Atenuada da Gripe
- LPS** – Lipopolissacarídeos
- NA** – Neuraminidase
- NACI** - Comité Consultivo Nacional de Imunização do Canadá
- NICD** - Instituto Nacional de Doenças Transmissíveis da África do Sul
- OMS** – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds Ratio*

SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

Teste HI – Ensaio de Inibição de Hemaglutinação

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

VAMPSS – Sistema de Vigilância de Vacinas e Medicamentos na Gravidez

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática dos principais eventos envolvidos no surgimento de uma pandemia de gripe, desde os dois principais reservatórios de animais até ao surto global em seres humanos _____ 2
- Figura 2:** Pandemias de gripe em humanos, desde 1918 _____ 3
- Figura 3:** Distribuição sazonal da gripe _____ 3
- Figura 4:** Exemplificação de um teste HI aplicado à deteção de anticorpos séricos em 3 amostras cujos títulos são respetivamente 1280 (A), 640 (B) e 40 (C) _____ 10
- Figura 5:** Efeitos adversos da infeção pelo vírus da gripe em mulheres grávidas, fetos e recém-nascidos _____ 13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Patologias e condições para as quais é recomendada a vacina da gripe	5
Tabela 2: Exemplos de possíveis situações prejudiciais ao desenvolvimento fetal	11
Tabela 3: Critérios de exclusão de mulheres grávidas nos estudos sobre a vacina da gripe	18
Tabela 4: Resumo dos estudos de grávidas vacinadas contra a gripe avaliando a segurança e/ou eficácia	25
Tabela 5: Desfechos observados entre mulheres grávidas vacinadas e não vacinadas	26
Tabela 6: Recomendações da vacina da gripe durante a gravidez	29
Tabela 7: Barreiras à imunização materna contra a gripe	30
Tabela 8: Soluções para melhorar a imunização materna contra a gripe	31
Tabela 9: Risco de malformações congénitas em função da idade gestacional	32
Tabela 10: Vacinação contra a gripe durante a gravidez e riscos absolutos para a malformação	34
Tabela 11: Resultado de malformações congénitas quando aplicada a vacina da gripe monovalente H1N1, com ou sem adjuvante, no primeiro trimestre de gravidez versus nenhuma vacina	35
Tabela 12: Tipos de malformações congénitas após administração da vacina da gripe monovalente H1N1	37

1. INTRODUÇÃO

Os vírus da gripe pertencem à família *Orthomyxoviridae* e estão incluídos em três géneros: A, B e C. O vírus da gripe A é classificado em subtipos de acordo com a antigenicidade da hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) - 18 subtipos HA (H1–H18) e 11 subtipos NA (N1–N11) – que são proteínas de superfície (Levinson W, 2016). Destes três géneros, o vírus da gripe A é considerado o mais comum e predominante durante as épocas de gripe, sendo o único conhecido por originar pandemias. O vírus da gripe B leva a surtos de gripe anualmente (epidemias sazonais), circulando em conjunto com o vírus da gripe A durante as estações frias. Por sua vez, o vírus da gripe C causa infeções leves do trato respiratório, não originando epidemias de gripe (CDC, 2019i; WHO, 2018b).

A gripe é uma doença viral respiratória altamente infecciosa e, uma das maiores causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo anualmente, com impacto significativo na saúde humana e na economia. Esta é causada pelo vírus da gripe A e/ou B (WHO, 2018b). O vírus da gripe B é encontrado exclusivamente em humanos (WHO, 2018a) e geralmente muda mais lentamente em termos de propriedades genéticas e antigénicas do que o vírus da gripe A (CDC, 2019i). Porém, quando a infeção ocorre em crianças, idosos ou indivíduos com comorbilidades, está associada a taxas de hospitalização e morte muito semelhantes às do vírus da gripe A (Liu D, 2019). Por outro lado, o vírus da gripe A, que circula na população humana de forma epidémica anualmente, não é encontrado exclusivamente em humanos, existindo diversas espécies suscetíveis de serem infetadas (Peteranderl, 2016; WHO, 2018a). Os seres humanos podem ser infetados por diversos vírus de origem zoonótica, como é exemplo os vírus da gripe aviária ou suína (WHO, 2018a) que, por sua vez podem originar vírus com potencial pandémico para a população humana, como foi o caso do vírus da gripe A(H1N1)pdm09 que originou a pandemia de 2009 (CDC, 2019i; DGS, 2018).

Os vírus da gripe podem sofrer variações antigénicas e alterações frequentes, o que torna a sua transmissão rápida e generalizada, resultando em epidemias anuais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que as epidemias sazonais de gripe podem causar de 3 a 5 milhões de casos graves anualmente e 290 000 a 650 000 mortes em todo o mundo (WHO, 2018b). Porém, estes números aumentam exponencialmente quando aparece uma nova estirpe do vírus, muito diferente do vírus da gripe sazonal circulante, porque a população tem pouca ou nenhuma imunidade para a nova estirpe. As pandemias de gripe ocorrem raramente (CDC, 2019e) e geralmente estão associadas a vírus que derivam de reservatórios aviários que, podem transmitir o vírus a um hospedeiro intermediário (suínos), onde adquire mais mutações adaptativas. Mutações estas que permitem a infeção do trato respiratório humano e a sua transmissão de forma eficiente de pessoa para pessoa (Figura

1). Estes vírus zoonóticos que circulam nas aves e nos suínos, apresentam altas taxas de mortalidade quando introduzidas no Homem (Peteranderl, 2016).

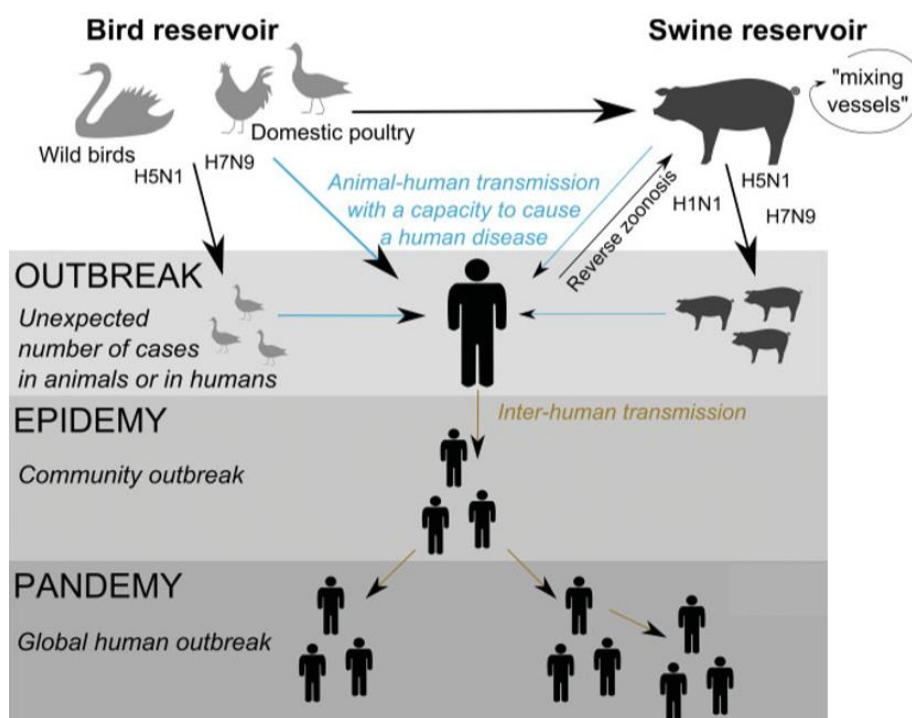


Figura 1: Representação esquemática dos principais eventos envolvidos no surgimento de uma pandemia de gripe, desde os dois principais reservatórios de animais até ao surto global em seres humanos. Adaptado de: (Peteranderl, 2016)

Nos últimos 100 anos tem-se conhecimento de quatro pandemias (Figura 2) e, os investigadores concordam que é inevitável a ocorrência de outra (CDC, 2019e). Em 1918 a chamada *Gripe Espanhola* (H1N1), a *Gripe Asiática* em 1957 (H2N2), a *Gripe de Hong Kong* em 1968 (H3N2) e, mais recentemente, a *Gripe Suína* de 2009 (H1N1). Curiosamente, a *Gripe Espanhola* de 1918 e a pandemia mais recente, a *Gripe Suína* de 2009, foram causadas por um vírus H1N1 (Peteranderl, 2016). A *Gripe Suína* de 2009, desde então renomeada como *pandemia 2009 H1N1*, causou mais de 200 000 mortes devido a doença respiratória e 80 000 mortes devido a insuficiência cardiovascular, onde mais de 80% dos casos afetaram a população com idade inferior a 65 anos (CDC, 2019a; Dawood F, 2012; Peteranderl, 2016).

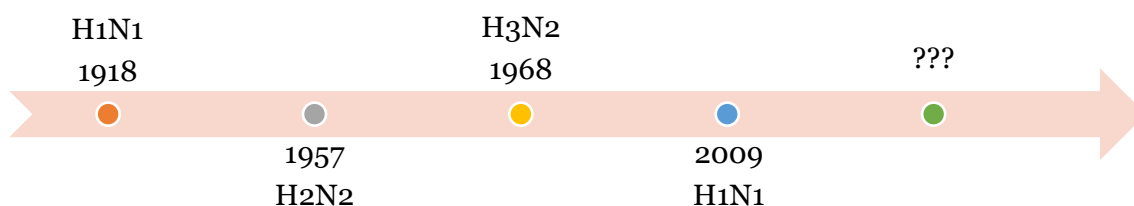


Figura 2: Pandemias de gripe em humanos, desde 1918.

A nível epidemiológico, o vírus da gripe é geralmente associado à estação fria (inverno) nas regiões temperadas (hemisfério norte e hemisfério sul) (DGS, 2018). Nas regiões tropicais e subtropicais, as épocas da gripe são menos definidas, o que faz com que as infeções sejam recorrentes durante todo o ano, como podemos ver na Figura 3 (Newman, 2018; WHO, 2018b).

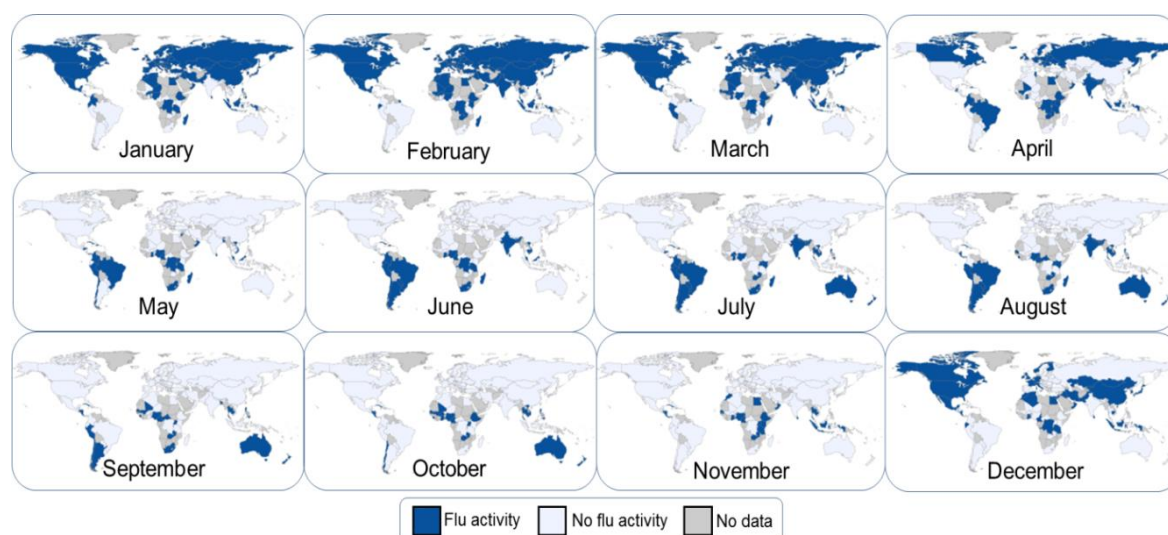


Figura 3: Distribuição sazonal da gripe.

Hemisfério norte: dezembro a abril; Hemisfério sul: abril a novembro; Regiões tropicais e subtropicais (centro): durante todo o ano. Adaptado de: (Newman, 2018)

O vírus da gripe transmite-se facilmente através de gotículas respiratórias quando um indivíduo infetado tosse ou espirra. Este também pode ser transmitido através do contacto com superfícies contaminadas (CDC, 2019e; Thain S, 2019).

A infeção pelo vírus da gripe pode ser assintomática ou causar doença respiratória moderada do trato respiratório superior, ou grave, quando leva a infeções do trato respiratório inferior, resultando em pneumonia com progressão para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e/ou até mesmo morte por insuficiência respiratória (Peteranderl, 2016). Os sintomas mais comuns da gripe incluem febre, dor de cabeça, calafrios, tosse, dor de garganta, dores musculares, mal-estar e fadiga generalizados, observados após 24 a 48 horas de incubação e persistindo de 2 a 8 dias (Peteranderl, 2016;

[Thain S, 2019; WHO, 2018b](#)). Tudo isto leva a que o vírus da gripe represente uma ameaça substancial à saúde humana global e com que seja monitorizado de perto para registar a sua atividade local de forma a projetar vacinas anuais e a combater surtos de novas estirpes que adquiriram a capacidade de atravessar a barreira entre espécies, com transmissão e infeção de seres humanos ([Peteranderl, 2016](#)).

A gripe sazonal atinge toda a população em geral, contudo crianças com idade inferior a 2 anos e indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos apresentam uma maior probabilidade de desenvolverem infeção e complicações pelo vírus da gripe. Facto que, faz com que o vírus da gripe esteja associado a uma curva de mortalidade em forma de U ([CDC, 2019g](#)). Contudo, durante as pandemias o vírus da gripe tem comportamentos imprevisíveis, como se constatou na pandemia de 2009 que, os indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos foram menos afetados, em certa medida, devido à imunidade adquirida através do contacto com o vírus H1N1 durante os anos que se seguiram à pandemia de 1918 (este vírus circulou no homem até 1957, ano em que emergiu a nova estirpe pandémica H2N2) ([Peteranderl, 2016](#)).

A vacina da gripe é fortemente recomendada a indivíduos sem contraindicações com idade igual ou superior a 6 meses, principalmente a grupos considerados prioritários ou de alto risco, incluindo ([CDC, 2019b](#)):

- Crianças com idade entre os 6 meses e os 5 anos;
- Indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos;
- Indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, principalmente as que vivem em lares de idosos e outras instituições de assistência a longo prazo;
- Indivíduos com distúrbios pulmonares crónicos, cardiovasculares, renais, hepáticos, neurológicos, hematológicos ou metabólicos (incluindo diabetes *mellitus*);
- Indivíduos com comorbilidades adicionais ou imunocomprometidos (submetidos a terapia imunossupressora ou com infeção por HIV);
- Mulheres que estão ou estarão grávidas durante a época da gripe;
- Crianças ou adolescentes, entre 6 meses e 18 anos, que recebem medicamentos contendo aspirina ou salicilato;
- Profissionais de saúde e outros prestadores de cuidados;
- Indivíduos extremamente obesos (com índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 40 em adultos).

Na Tabela 1 estão descritas as patologias e condições para as quais se recomenda a vacina da gripe, devido ao risco aumentado de desenvolvimento de complicações após infeção pelo vírus da gripe.

Tabela 1: Patologias e condições para as quais é recomendada a vacina da gripe.

Patologia/Condição	Exemplos
Respiratória	▪ Asma sob terapêutica com corticoides ▪ Doença pulmonar obstrutiva crónica (bronquite crónica), fibrose quística, fibrose pulmonar intersticial, displasia broncopulmonar
Cardiovascular	▪ Cardiopatia congénita ▪ Cardiopatia hipertensiva ▪ Insuficiência cardíaca crónica ▪ Cardiopatia isquémica
Renal	▪ Insuficiência renal crónica ▪ Síndrome nefrótica
Hepática	▪ Cirrose ▪ Atresia biliar ▪ Hepatite crónica
Neuromuscular	▪ Com comprometimento da função respiratória, da eliminação de secreções ou risco aumentado de aspiração de secreções
Hematológica	▪ Hemoglobinopatias
Imunodepressão	▪ Primária ▪ Secundária a doença: ▪ Infeção por HIV ▪ Asplenia ou disfunção esplénica ▪ Secundária a terapêutica: ▪ Quimioterapia imunossupressora ▪ Terapêutica com fármacos biológicos ▪ Tratamento atual ou programado com corticoides sistémicos por mais de 1 mês
Diabetes mellitus	▪ Tipo 1 ▪ Tipo 2 em tratamento com antidiabéticos
Doenças genéticas	▪ Trissomia 21 ▪ Défice de alfa-1 antitripsina sob terapêutica de substituição
Obesidade	▪ IMC igual ou superior a 30
Transplantação	▪ Órgãos sólidos ou medula óssea
Terapêutica com salicilatos	▪ Crianças e adolescentes (6 meses a 18 anos) em terapêutica prolongada com salicilatos

Adaptado de: (CDC, 2019j; DGS, 2019)

Diversos estudos, especialmente da OMS ou do Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América, identificam a gravidez como fator de risco perante o vírus da gripe (CDC, 2019b; WHO, 2018b). Grande parte desses estudos, demonstraram que, durante a gripe sazonal e durante as pandemias ocorridas no século XX, as mulheres grávidas apresentaram um risco aumentado de desenvolvimento de doença grave, hospitalização e mortalidade devido à infeção pelo vírus da gripe em comparação com a população em geral (Buchy F, 2020; Fabiani, 2015), principalmente se contraírem o vírus em períodos mais avançados da gravidez (Nayak, 2016).

A gravidez está associada a alterações imunológicas e fisiológicas no organismo materno (Buchy F, 2020). Além de, proporcionar o meio compatível para o desenvolvimento do feto, as mulheres grávidas tendem a desenvolver complicações mais graves devido à sua condição imunológica e fisiológica alterada (Buchy F, 2020; Nayak, 2016). Na gravidez a resposta imunológica esperada perante a infeção pelo vírus da gripe é alterada – aumento da imunidade mediada por anticorpos e supressão da imunidade mediada por células – de forma ao organismo da gestante tolerar o crescimento do feto (Cunningham, 2019; Somerville, 2018). No entanto, a redução da resposta imunológica, principalmente durante o terceiro trimestre (Fabiani, 2015), acarreta um aumento da suscetibilidade das mulheres grávidas a patógenos respiratórios e a outros tais como: vírus da hepatite E, vírus herpes simplex, vírus da gripe e malária (Buchy F, 2020; Cunningham, 2019). Facto pelo qual, durante a gravidez existe um maior risco de desenvolver complicações graves aquando infeção pelo vírus da gripe, que podem levar a hospitalização e/ou morte (Chalise U, 2019; Nayak, 2016; Thain S, 2019). Complicações estas que podem afetar o desenvolvimento fetal e levar a efeitos adversos (CDC, 2019h).

A presença do feto e da placenta exige mudanças complexas no sistema imunológico e cardiopulmonar materno para sustentar uma gravidez viável (Buchy F, 2020; Somerville, 2018). As alterações imunológicas ocorrem localmente a nível da mucosa uterina e do sistema imunológico (Somerville, 2018) e são mediadas por hormonas, citocinas e células imunológicas, verificando-se ainda alterações estruturais (tais como a remodelação do endométrio) (Vojtek I, 2018). As alterações cardiopulmonares que ocorrem durante a gravidez incluem, aumento da frequência cardíaca, volume sistólico, consumo de oxigénio e capacidade pulmonar reduzida (Buchy F, 2020). Estas podem aumentar o risco de hipoxemia e contribuir para o aumento da gravidade da infeção pelo vírus da gripe.

A imunização materna baseia-se no conceito de que os níveis de anticorpos específicos maternos são aumentados e fornecem proteção ao recém-nascido até que este possa adquirir a sua própria resposta imunológica. A transferência de anticorpos maternos de

mães imunizadas através da placenta para o feto é iniciada por volta da semana 17 da gravidez e aumenta com a gestação. Após o parto, os anticorpos maternos podem continuar a ser transferidos para a criança através do leite materno (Buchy F, 2020).

Casos de complicações durante a gravidez e a nível do feto (aborto espontâneo, parto prematuro e/ou morte fetal) são observados principalmente durante as pandemias de gripe, independente da virémia materna, transmissão transplacentária e infeção fetal direta (Somerville, 2018). Além disso, verifica-se uma maior incidência de hospitalizações associadas à gripe durante o primeiro ano de vida do recém-nascido porque são imunologicamente imaturos, sem qualquer tipo de defesa contra o vírus da gripe (Nunes, 2018). Crianças com menos de 6 meses de idade têm sido consistentemente reconhecidas como tendo um risco aumentado de desenvolver complicações devido à infeção pelo vírus da gripe, uma vez que se verifica que a gripe causa aproximadamente 374 000 hospitalizações por ano em crianças com menos de 1 ano de idade, das quais 228 000 têm menos de 6 meses (Lafond K, 2016). Assim, a menos que contraindicado, as vacinas da gripe sazonal são internacionalmente recomendadas para mulheres grávidas, independentemente da presença de condições de risco preexistentes (Fabiani, 2015) ou da idade gestacional. Facto que, corrobora com as recomendações da OMS para as mulheres grávidas que são consideradas um grupo prioritário para a vacinação contra a gripe (WHO, 2018b).

Com base nas evidências apresentadas, é fundamental a existência de um tratamento eficiente e oportuno para as infeções graves da gripe, o que torna a vacinação preventiva uma ferramenta essencial na diminuição da morbilidade causada pela gripe e da carga socioeconómica (Peteranderl, 2016). Mesmo que as diretrizes para a vacinação contra o vírus da gripe variem, a vacinação geralmente é recomendada, primeiramente a pacientes com comorbilidades preexistentes ou alto risco de exposição e, de seguida a toda a população (superior a 6 meses de idade) a fim de melhorar a imunidade (uma vez que a imunidade fornecida pela vacinação diminui com o tempo) e reduzir a probabilidade de ocorrerem complicações mais graves ou incidência destas (WHO, 2018b). Assim, a vacinação contra o vírus da gripe representa a intervenção da saúde pública mais eficaz para prevenir infeções sazonais, hospitalização e mortalidade (Restivo, 2018).

As estratégias mais usadas para prevenir e combater a infeção pelo vírus da gripe incluem a vacinação e a terapia antivírica, respetivamente, que mostram eficácia variável devido à variação antigénica (Peteranderl, 2016). Porém, os antivíricos para a gripe não substituem a vacina da gripe. Embora a eficácia da vacina da gripe possa variar, é a única e a melhor maneira de prevenir a gripe sazonal e as suas complicações potencialmente graves. Os

antivíricos para a gripe são uma segunda linha de defesa usados para tratar a gripe em si (CDC, 2019j), dos quais se pode salientar (CDC, 2020a):

- Oseltamivir, Zanamivir ou Peramivir - Inibidores da neuraminidase que bloqueia a enzima neuraminidase viral e tem atividade contra os vírus da gripe A e B. São os mais utilizados e devem ser prescritos o mais rápido possível para maximizar os benefícios terapêuticos (até 48 horas após início dos sintomas);
- Baloxavir marboxil – Bloqueador da replicação viral e ativo contra os vírus da gripe A e B;
- Amantadina e Rimantadina - Fármacos antivirais da classe dos adamantanos que têm como alvo a proteína do canal iónico M2 dos vírus da gripe A, sendo ativos contra o vírus da gripe A, mas não contra o vírus da gripe B. O seu uso não é recomendado devido ao elevado nível de resistência dos vírus da gripe que, circulam neste momento, a estes fármacos.

O CDC e a OMS recomendam o uso de vacinas da gripe licenciadas, incluindo: as vacinas inativadas da gripe (IIV) e as vacinas vivas atenuadas da gripe (LAIV) (CDC, 2020b; WHO, 2020c). A IIV é recomendada à população com idade igual ou superior a 6 meses, incluindo mulheres grávidas e indivíduos com doenças crónicas. Os vírus incluídos nestas vacinas são inativados para que não causem gripe (WHO, 2020c). A LAIV é recomendada apenas à população entre os 2 e 49 anos e sem doenças subjacentes. No entanto, apesar de a LAIV não ser recomendada a mulheres grávidas (WHO, 2020c) pode ser usada no período pós-parto (Somerville, 2018). Os vírus incluídos nestas vacinas são atenuados e não causam gripe. Contudo, podem causar sintomas leves (incluindo congestão nasal, febre ou dor de garganta) (WHO, 2020c). Ambas as vacinas (IIV e LAIV) podem ser trivalentes (contêm na sua composição dois vírus contra a gripe A H1N1 e H3N2, e um contra o vírus da gripe B) ou quadrivalentes (contêm na sua composição dois vírus contra a gripe A e dois contra o vírus da gripe B). Quando disponível, a vacina da gripe quadrivalente deve ser a utilizada (Nayak, 2016; WHO, 2020c).

A produção de vacinas da gripe sazonal é baseada no cultivo do vírus da gripe em ovos embrionados ou em culturas de células, os quais são depois purificados e inativados (Bricks, 2016). Por outro lado, a composição das vacinas da gripe é atualizada anualmente pela OMS com base em informações recolhidas do Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe (GISRS) (WHO, 2020c), uma vez que não existem duas épocas de gripe iguais e nem sempre o vírus da gripe A é o mais frequente, como se constatou na época de 2017/2018, em que o vírus da gripe B foi predominante em relação ao vírus da gripe A (Liu D, 2019). Assim sendo, em cada época de gripe um ou mais componentes das vacinas podem ser alterados em

função do vírus da gripe A ou B circulantes recentemente e com mais frequência (WHO, 2020c).

Adicionalmente, as vacinas da gripe podem conter ou não adjuvantes, isto é, um componente adicionado à vacina para ajudar a criar uma resposta imunológica mais forte à vacinação (CDC, 2019d). As vacinas da gripe com adjuvantes são licenciadas e aprovadas apenas para uso em indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, uma vez que, geralmente apresentam uma resposta imunológica mais fraca à vacinação do que quando comparada com os indivíduos mais jovens. Um dos adjuvantes mais usado é o MF59 – uma emulsão óleo-em-água de óleo de esqualeno (CDC, 2019d).

Atualmente, os vírus da gripe que circulam em humanos incluem: os vírus da gripe A H1N1 e H3N2 e os vírus da gripe B da linhagem Yamagata e Victoria (WHO, 2018b). Assim e, de acordo com as recomendações da OMS, as vacinas quadrivalentes da gripe, produzidas em ovos embrionados, que vão estar disponíveis na época 2020/2021 para o Hemisfério Norte, são constituídas por (WHO, 2020a):

- Uma estirpe viral do tipo A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09;
- Uma estirpe viral do tipo A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2);
- Uma estirpe viral do tipo B (linhagem Victoria) semelhante a B/Washington/02/2019;
- Uma estirpe viral do tipo B (linhagem Yamagata) semelhante a B/Phuket/3073/2013.

No caso das vacinas quadrivalentes da gripe, produzidas em culturas de células, que vão estar disponíveis na época 2020/2021 para o Hemisfério Norte, são constituídas por (WHO, 2020a):

- Uma estirpe viral do tipo A/Hawaii/70/2019 (H1N1)pdm09;
- Uma estirpe viral do tipo A/Hong Kong/45/2019 (H3N2);
- Uma estirpe viral do tipo B (linhagem Victoria) semelhante a B/Washington/02/2019;
- Uma estirpe viral do tipo B (linhagem Yamagata) semelhante a B/Phuket/3073/2013.

No caso das vacinas trivalentes da gripe, que estarão disponíveis na época 2020/2021 para o Hemisfério Norte, apenas não contêm na sua composição o vírus da gripe B da linhagem Yamagata (WHO, 2020a).

Adicionalmente e, por forma a determinar rapidamente se os vírus usados na vacina da gripe sazonal são antigenicamente semelhantes aos vírus da gripe circulantes e, portanto, capaz de produzir uma resposta imunológica contra eles, recorre-se a ensaios de inibição da hemaglutinação (teste HI) (Figura 4). O teste HI permite então, medir até que ponto os anticorpos contra o vírus da gripe se ligam ao vírus da gripe (CDC, 2019k). Atualmente, níveis específicos de títulos de anticorpos HI de 40 (isto é, com uma diluição de 1:40) são reconhecidos como uma correlação imunológica correspondente a uma redução de 50% no risco de contrair gripe (CDC, 2019k; Cuningham, 2019).

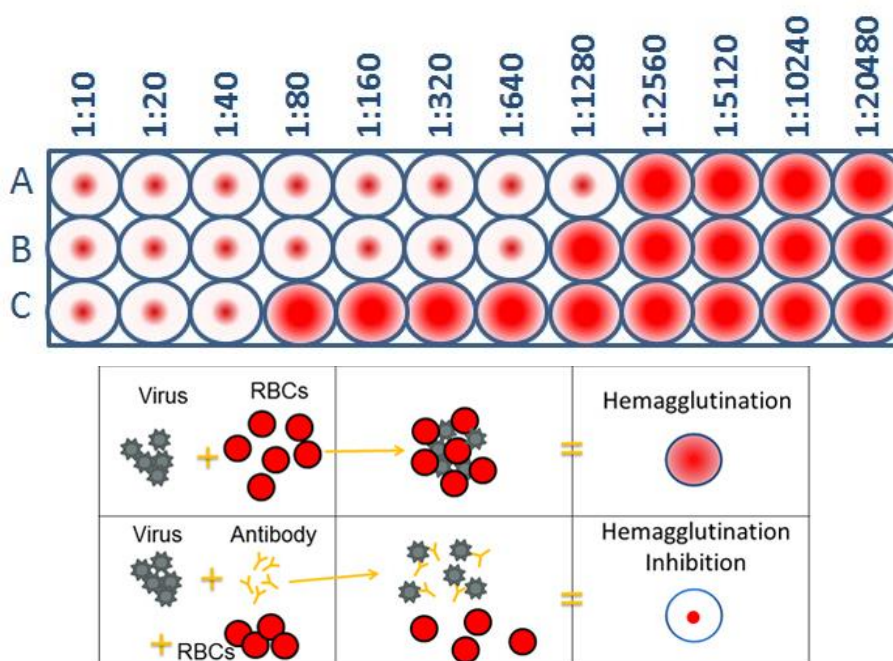


Figura 4: Exemplificação de um teste HI aplicado à detecção de anticorpos séricos em 3 amostras cujos títulos são respetivamente 1280 (A), 640 (B) e 40 (C). Adaptado de: (CDC, 2019k)

Recomendações para a vacinação contra a gripe de mulheres grávidas, bem como de indivíduos com doenças crónicas ou com mais de 65 anos, já vem desde a década de 1960 (CDC, 2019f). No entanto, foi apenas após a observação de mulheres grávidas como um dos grupos mais afetado durante a pandemia de gripe H1N1 de 2009, que a aceitabilidade da vacinação neste grupo aumentou exponencialmente (Madhi, 2018). Desde então, a OMS recomenda que as gestantes sejam vistas como um grupo prioritário a receber a vacina da gripe, podendo ser dada em qualquer trimestre da gravidez (WHO, 2018b).

A vacinação contra o vírus da gripe durante a gravidez ajuda a proteger a mulher grávida e o recém-nascido durante os primeiros meses após o nascimento (enquanto não tem idade para ser vacinado) de uma possível infeção pelo vírus da gripe (CDC, 2019h). Contudo, apesar das recomendações da OMS para priorizar as mulheres grávidas nos programas

nacionais de vacinação contra a gripe, as taxas de vacinação em mulheres grávidas geralmente permanecem muito mais baixas do que as propostas pelos objetivos nacionais (Buchy F, 2020). Tal facto é justificado, não só pela falta de informação sobre o potencial efeito do vírus da gripe no desenvolvimento do feto e possíveis efeitos teratogénicos que a gripe pode acarretar, mas também pela falta de recomendação por parte dos profissionais de saúde (Fabiani, 2015).

A recomendação de diversas organizações, como a OMS e o CDC (EUA), para a vacinação contra o vírus da gripe durante qualquer trimestre da gravidez (CDC, 2019h; WHO, 2018b), levam a que seja necessário avaliar o potencial risco da vacina interferir na embriogénese ou levar ao desenvolvimento de anomalias congénitas (também conhecidas como defeitos congénitos, distúrbios congénitos ou malformações congénitas) que, estarão presentes no nascimento, afetando potencialmente a saúde, o desenvolvimento e/ou a sobrevivência do recém-nascido (DeSilva, 2016).

A fase da embriogénese ocorre no primeiro trimestre da gravidez (nomeadamente entre a 1ª e 13ª semana) e é geralmente considerada um período crítico do desenvolvimento fetal, sendo um período mais suscetível à ocorrência de anomalias causadas pela utilização de teratogénicos (DeSilva, 2016). Teratogénicos como medicamentos, agentes infecciosos e toxinas ambientais, bem como drogas ilícitas e outras exposições maternas (Tabela 2), podem prejudicar o desenvolvimento fetal e aumentar o risco de uma ou mais anomalias congénitas (DeSilva, 2016; Kharbanda, 2017).

Tabela 2: Exemplos de possíveis situações prejudiciais ao desenvolvimento fetal.

Medicação teratogénica	Acitretina
	Carbamazepina
	Lítio
	Metotrexato
	Primidona
	Topiramato
	Talidomida
	Ácido valpróico
Infeções teratogénicas	Varfarina
	Citomegalovírus
	Sífilis
	Rubéola
	Varicela
Vacinas de vírus vivos	Toxoplasmose
	Raiva
	Rotavírus
	Febre amarela
	Sarampo

Adaptado de: (Kharbanda, 2017)

Assim e, com o intuito de consciencializar as mulheres grávidas sobre os benefícios e/ou riscos da vacinação contra a gripe e esclarecer dúvidas que possam existir sobre a vacina da gripe, o principal objetivo deste trabalho é avaliar os benefícios e riscos associados à infeção e vacinação contra o vírus da gripe durante a gravidez e os obstáculos que atuam contra a aderência à vacinação durante a gravidez.

2. GRIPE NA GRAVIDEZ

A gripe é uma infecção viral frequente e estima-se que atinge 11% das mulheres grávidas (Buchy F, 2020). Em comparação com a população em geral, as mulheres grávidas correm um risco aumentado de doença grave devido à infecção pelo vírus da gripe. Alguns dos riscos associados à infecção pelo vírus da gripe na mãe, no feto e no recém-nascido estão resumidos na Figura 5.

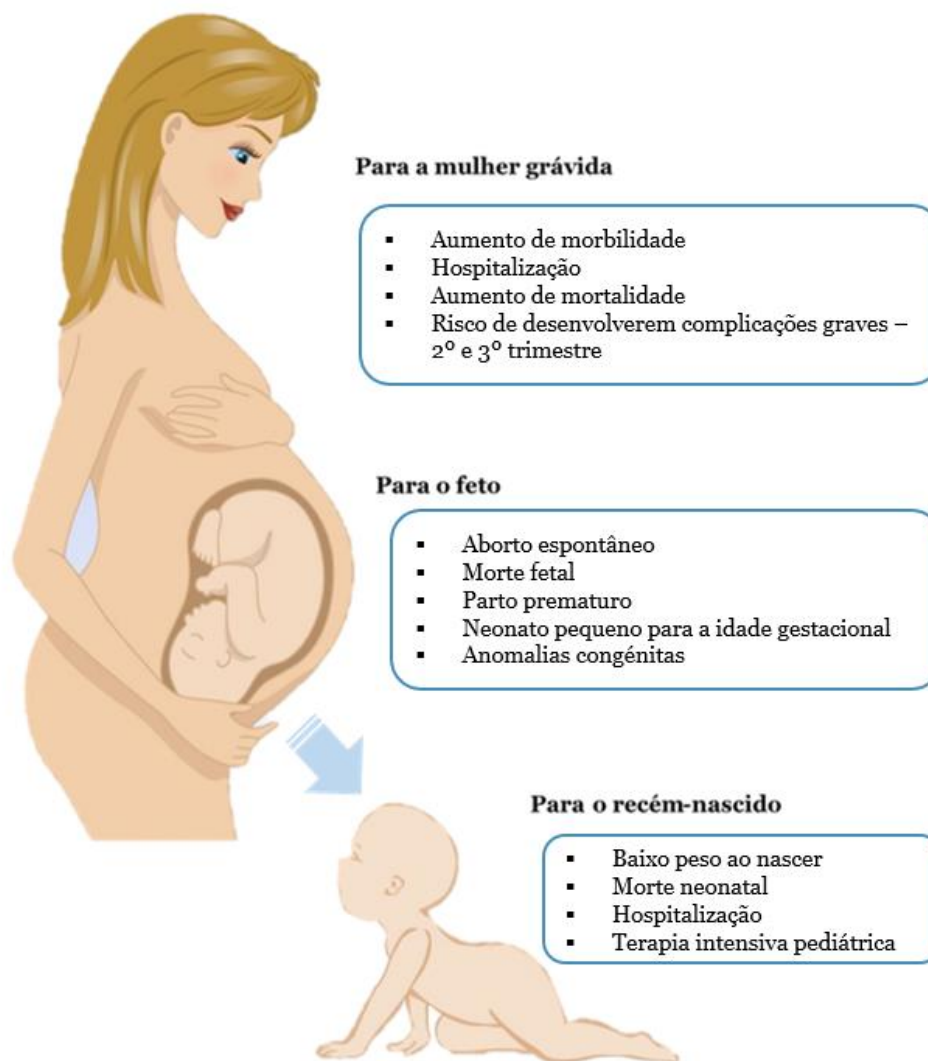


Figura 5: Efeitos adversos da infecção pelo vírus da gripe em mulheres grávidas, fetos e recém-nascidos. Adaptado de: (Buchy F, 2020)

O aumento da vulnerabilidade das mulheres grávidas à gripe foi documentado durante as pandemias de 1918 e 2009 (Sakala I, 2016). A mortalidade entre mulheres grávidas foi de 27% durante a pandemia da gripe espanhola em 1918 (Buchy F, 2020) e de 2,2% durante a pandemia de 2009 (Callaghan W, 2016; Rasmussen S, 2014; Rojas-Suarez J, 2014). Por sua vez, a pandemia de 2009, causada pelo vírus gripe H1N1, levou à necessidade de uma importante e oportuna resposta global a nível da saúde pública, onde em poucos meses após

a declaração de pandemia, uma nova vacina H1N1 já estava disponível para uso (CDC, 2019a). A urgência na resposta não se limitou à necessidade de desenvolver uma vacina eficaz, mas também à rápida avaliação dos riscos e segurança da vacina, não só para a população em geral, mas principalmente quando aplicada a grupos de risco, como as gestantes (Conlin, 2018).

Os dados das epidemias sazonais e das pandemias confirmaram que as mulheres grávidas estão sujeitas a um risco aumentado de desenvolverem complicações graves quando infectadas pelo vírus da gripe (Chalise U, 2019; Somerville, 2018), sendo o risco maior durante o segundo e terceiro trimestre (Buchy F, 2020). Além disso, a gripe durante a gravidez pode levar a diversos desfechos, tais como: anomalias congénitas, aborto espontâneo (definido como morte do feto antes de 22 semanas de gestação), morte fetal (definido como morte do feto após 22 semanas de gestação), parto prematuro (definido como nascimento antes de 37 semanas completas de gestação) e neonato pequeno para a idade gestacional (definido como um recém-nascido vivo com peso abaixo do percentil 10 para a idade gestacional) (Ahrens, 2014; Chalise U, 2019; Giles, 2019; Thain S, 2019). Porém, a infeção pré-natal pelo vírus da gripe está associada ao aumento do risco de esquizofrenia e autismo durante o primeiro e/ou segundo trimestre da gravidez (Xia, 2014).

A gripe tem sido consistentemente observada como causa do aumento da morbilidade e mortalidade tanto para a mãe como para o feto (CDC, 2019h; Giles, 2019). O número de hospitalizações devido à gripe é 4 a 7 vezes maior nas mulheres grávidas, apresentando-se ainda com complicações respiratórias, cardiovasculares e metabólicas, parto prematuro ou sofrimento fetal (Buchy F, 2020; Somerville, 2018). Em gestantes com idades mais avançadas e/ou com comorbilidades subjacentes, incluindo asma ou diabetes, o risco de morbilidade aumenta 3 a 4 vezes (Buchy F, 2020; Nayak, 2016; Somerville, 2018). A obesidade em mulheres grávidas também está associada a um aumento da morbilidade (WHO, 2012b).

A gravidez por si só já deixa as gestantes vulneráveis a diversas doenças, mas quando se adiciona o vírus da gripe à equação, o seu efeito pode levar a resultados prejudiciais tanto para a gestante como para o feto (Nayak, 2016). Estudos mostraram que 63,6% das grávidas com infeção pelo vírus da gripe tiveram partos prematuros, 43,8% dos recém-nascidos nasceram com baixo peso (WHO, 2012b) e 83,3% dos recém-nascidos necessitaram de ser hospitalizados em unidades de cuidados intensivos (UCI) ou morreram (Nayak, 2016). Isto está de acordo com o facto da infeção pelo vírus gripe poder ter um efeito direto no crescimento intrauterino. Recém-nascidos de gestantes com títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) superior a 40 apresentaram um peso menor ao nascer (no mínimo

100g mais baixo) do que os recém-nascidos de gestantes que apresentavam níveis de anticorpos inferiores ou iguais a 40 (Laake, 2018). Adicionalmente, também foi observado um possível risco de malformações fetais, para além do risco de pneumonia em gestantes com infeção pelo vírus da gripe (Nayak, 2016). Quando a infeção pelo vírus da gripe ocorre no início da gestação o risco de anomalias congénitas no feto mostrou-se duas vezes maior do que em períodos mais avançados da gravidez (Zhang, 2018).

As mulheres grávidas com infeção pelo vírus da gripe A durante a pandemia de 2009 ou com infeção grave pelo vírus da gripe B mostraram um maior risco de hospitalização quando comparadas com mulheres em idade fértil da população em geral (Rein J, 2014; Somerville, 2018). Durante a primeira onda da pandemia da gripe de 2009, 75% das gestantes com infeção grave pelo vírus da gripe, tiveram uma cesariana antes ou durante a permanência na UCI (Somerville, 2018).

2.1. Gripe na gravidez e efeitos no feto

Os efeitos da infeção pelo vírus da gripe no feto durante a gravidez ainda não estão totalmente esclarecidos. A virémia materna e a transmissão transplacentária do vírus da gripe são muito incomuns, no entanto, mesmo na ausência de infeção fetal, foram observadas anomalias ou consequências no feto (Somerville, 2018). Principalmente durante as pandemias, a gripe esteve associada significativamente a um aumento das taxas de aborto espontâneo, parto prematuro, baixo peso ao nascer e morte fetal (Figura 5) (Buchy F, 2020; Somerville, 2018), para além de, durante o primeiro trimestre de gestação, haver um risco aumentado de hidrocefalia, fenda labial, tubo neural e defeitos cardíacos congénitos (Restivo, 2018). Outro fator de risco que pode levar ao desenvolvimento de anomalias ou consequências para o feto durante a infeção pelo vírus da gripe é a hipertermia materna, que tem sido associada a defeitos do tubo neural (Somerville, 2018).

Em mulheres grávidas hospitalizadas com doença respiratória foi descrito um risco acrescido de sofrimento fetal, mortalidade fetal, parto prematuro e necessidade de cesariana em comparação com mulheres grávidas hospitalizadas sem doença respiratória (Ribeiro A, 2018). Consequentemente, as crianças também apresentam uma maior probabilidade de desenvolverem complicações e incidência de hospitalização, principalmente crianças com idade inferior a 6 meses (Buchy F, 2020). Estudos realizados em crianças com menos de 12 meses, hospitalizadas com gripe demonstraram que, 10% necessitam de internamento em terapia intensiva e 4% necessitam de ventilação mecânica (Buchy F, 2020; Chaves S, 2014). A presença de condições de alto risco no recém-nascido, como doença pulmonar, doença cardiovascular ou distúrbios neurológicos e

neuromusculares, aumentam significativamente o risco de internamento em terapia intensiva, sendo superior em crianças com idade inferior a 3 meses (Buchy F, 2020).

Tem sido colocada a hipótese de que os abortos associados à infeção pelo vírus da gripe sejam em grande parte secundários à hipertermia materna e aos efeitos das citocinas pró-inflamatórias, em vez de efeitos diretos do vírus na placenta, embrião ou feto (Somerville, 2018). Por outro lado, os efeitos da infeção materna no desenvolvimento do cérebro fetal são provavelmente resultado da resposta materna inflamatória e não do efeito viral direto no feto (Somerville, 2018).

Adicionalmente, diversos estudos têm demonstrado que a infeção pelo vírus da gripe e exposição a endotoxinas bacterianas durante a gravidez, nomeadamente lipopolissacarídeos (LPS) (componente da parede celular de bactérias Gram-negativas), afeta diversas fases da neurogénese, provocando a diminuição da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência de neurónios após o nascimento (Xia, 2014). Pode ainda, levar a alterações comportamentais marcadas após o nascimento (Xia, 2014).

3. VACINAÇÃO CONTRA A GRIPE NA GRAVIDEZ

As IIV, disponíveis desde os anos sessenta, têm mostrado um bom perfil de segurança na população em geral. No entanto, a maioria das informações sobre a segurança da vacina da gripe nas mulheres grávidas vem de estudos de farmacovigilância pós-comercialização, sendo estas excluídas dos ensaios clínicos realizados para obter a autorização para comercialização (Fabiani, 2015). No caso dos estudos epidemiológicos, com foco na segurança da vacinação nas mulheres grávidas, estes não mostraram um risco aumentado para complicações ou efeitos adversos associados à administração da IIV (Chalise U, 2019; Fabiani, 2015; Giles, 2019). Além disso, a vacina é a principal estratégia para prevenir e controlar a infeção pelo vírus da gripe, tendo a capacidade de conferir proteção passiva aos fetos e recém-nascidos através da vacinação materna durante a gravidez, tornando-a numa alternativa atraente à imunização direta (Nunes, 2018; Thain S, 2019).

A OMS, o CDC (EUA), o Comité Consultivo para Práticas de Imunização (ACIP), bem como o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG), recomendam que todas as mulheres grávidas ou aquelas que planeiam engravidar devem ser vacinadas contra a gripe antes ou durante a época da gripe, podendo a vacina ser administrada a qualquer momento, independentemente da idade gestacional (CDC, 2019h; Chalise U, 2019; Chambers, 2016; Jeong, 2019; McMillan, 2015; NIAC, 2020; Thain S, 2019; WHO, 2018b). Porém, a taxa de adesão da vacina é muito variada, especialmente em países de baixos/médios rendimentos onde a vacinação materna contra a gripe não foi incorporada nos programas de imunização de rotina (Jeong, 2019). A baixa aceitação da vacina da gripe, por parte das mulheres grávidas, deve-se não só à falta de consciencialização sobre os riscos da infeção e dos seus efeitos na gravidez, mas também ao facto dos profissionais de saúde não recomendarem a vacinação (Jeong, 2019; McMillan, 2015), uma vez que a sua segurança é uma preocupação (Giles, 2019; Polyzos, 2015). Estudos do CDC (EUA) fornecem fortes evidências de que as mulheres grávidas que recebem recomendação de um profissional ou a oferta de vacinação, apresentam uma probabilidade 20 a 100 vezes maior de aderirem à vacina (Chalise U, 2019). Além disso e, de forma a aumentar a taxa de adesão à vacinação contra a gripe, estudos de vigilância de fase 4 (estudos de vigilância pós-comercialização para estabelecer o valor terapêutico, o aparecimento de reações adversas ou confirmação das reações adversas já conhecidas e estratégias de tratamento) foram realizados para avaliar os efeitos no feto, os quais incluíam parto prematuro, neonato pequeno para a idade gestacional, baixo peso ao nascer, aborto espontâneo, anormalidades congénitas e morte fetal (Jeong, 2019). Alguns estudos ainda avaliaram a possível associação entre a vacina da gripe e a ocorrência de malformações congénitas específicas nos primeiros 6 meses de vida (como por exemplo, do sistema nervoso, sistema cardiovascular, sistema digestivo e sistema urogenital)

(Fabiani, 2015). Adicionalmente, na grande maioria dos estudos, são aplicados critérios de exclusão de forma a não existirem resultados que gerem confusão ou falsos positivos. Na Tabela 3 estão listados alguns dos critérios de exclusão aplicados (Fabiani, 2015).

Tabela 3: Critérios de exclusão de mulheres grávidas nos estudos sobre a vacina da gripe.

Doenças relacionadas com a gravidez

Mútiplos nascimentos

Idade inferior a 13 anos ou superior a 55 anos

Idade gestacional do parto superior a 45 semanas

Mulheres dando à luz, mas com um resultado abortivo registado para a mesma gravidez

Diabetes gestacional

Expostas a medicamentos teratogénicos

Neoplasias

Infeções virais durante a gravidez

Infeções virais congénitas

Malformações cromossómicas diagnosticadas pós-parto

Adaptado de: (Fabiani, 2015; Kharbanda, 2017)

A OMS classifica as mulheres grávidas como um grupo prioritário para receber a IIV (WHO, 2018b), pelo que a grande parte dos países com elevado rendimento incorporaram estas recomendações nos programas de imunização (Jeong, 2019). Isto está de acordo com diversos estudos que sugerem que a imunização pré-natal contra a gripe confere proteção, tanto às mulheres grávidas como aos recém-nascidos, contra os efeitos adversos que podem advir de uma infeção pelo vírus da gripe (Buchy F, 2020; Giles, 2019; Polyzos, 2015). Os vários estudos têm demonstrado que a IIV é eficaz na proteção de mulheres grávidas e dos fetos através da transferência transplacentária de anticorpos (Bricks, 2016), para além de estar associada a um breve aumento de biomarcadores inflamatórios maternos (DeSilva, 2016). Este benefício duplo da IIV na prevenção da infeção foi comprovado em ensaios clínicos recentes, randomizados (ECR), de fase 4 e de larga escala (Jeong, 2019).

A maioria dos estudos mostrou que a resposta de anticorpos à IIV é semelhante em mulheres grávidas e não grávidas, embora haja algum debate sobre o momento ideal da vacinação na gravidez (Buchy F, 2020; Cunningham, 2019). Os anticorpos maternos específicos para o vírus da gripe induzidos pela vacina parecem ter altas taxas de transferência transplacentária (cerca de 87-99%) (Buchy F, 2020). O tempo de vida dos

anticorpos, induzidos pela vacinação materna, na circulação do recém-nascido é de 43 a 53 dias, que é semelhante ao tempo de vida dos anticorpos induzidos após uma infecção natural materna pelo vírus da gripe. Assim, os anticorpos induzidos pela vacinação materna parecem persistir por pelo menos 3 meses nos recém-nascidos (Buchy F, 2020).

A vacinação no início da gravidez pode oferecer maior proteção contra a gripe para a mulher grávida e trazer uma série de benefícios para os recém-nascidos (Buchy F, 2020; Wu, 2018; Xia, 2014), dos quais se citam: diminuição da taxa de baixo peso ao nascer (Buchy F, 2020); efeito profundo na neurogênese, incluindo proliferação e diferenciação neuronal, que promove o desenvolvimento cerebral; promoção da função cognitiva; contribuição para a função comportamental; indução de uma resposta imunológica capaz de bloquear a neuroinflamação induzida por LPS, prevenindo lesões neurais e cognitivas (Wu, 2018; Xia, 2014). Quando tomada no início da gravidez, a vacina também fornece proteção contra a gripe ao longo da gravidez, mas em contrapartida pode aumentar a probabilidade dessa imunidade não durar até ao parto (Katz J, 2018). Níveis mais baixos de anticorpos no momento do parto podem resultar em níveis mais baixos de transferência transplacentária de anticorpos e no cordão umbilical, reduzindo os benefícios para o recém-nascido, para além da perda de imunidade da gestante poder aumentar a probabilidade desta se tornar uma fonte de transmissão de vírus para o recém-nascido, isto é, de aumentar o risco de gripe materna durante o período pós-parto, com transmissão ao recém-nascido (Buchy F, 2020). Estas evidências, de que há um declínio imunológico até ao momento do parto quando as mulheres grávidas são imunizadas no início da gravidez, levam à recomendação e necessidade de que estas recebam uma segunda dose se ainda estiveram grávidas na época seguinte de gripe (Buchy F, 2020; Cunningham, 2019). Com isto, as gestantes que receberam duas doses ou uma dose mais alta apresentam o benefício de poderem ter níveis mais altos de anticorpos no momento do parto e transferirem mais anticorpos para o feto (Cunningham, 2019).

Por outro lado, as mulheres grávidas que foram vacinadas mais tardiamente tiveram uma maior resposta imunológica à vacinação (Buchy F, 2020; Cunningham, 2019). A resposta à vacina da gripe foi 1,33-1,96 vezes maior em mulheres vacinadas durante o terceiro trimestre da gravidez quando comparado com mulheres vacinadas nos dois trimestres anteriores (Cunningham, 2019). Foi mostrado ainda que, a vacinação mais tardia na gravidez aumenta 1,21-1,64 vezes a transferência de anticorpos maternos para o feto (Cunningham, 2019). Adicionalmente, também se verificou que os títulos de anticorpos protetores no sangue do cordão umbilical foram 1,81 a 2,96 vezes maiores do que nas amostras de sangue materno no momento do parto (Buchy F, 2020). Alguns estudos relataram taxas de seroproteção ou seroconversão significativamente mais altas para mulheres vacinadas

durante o segundo ou terceiro trimestre (Buchy F, 2020; Cuningham, 2019), demonstrando que tal pode induzir títulos de anticorpos HI do vírus da gripe superiores ou iguais a 1:40 (considerados seroprotetores) em 93% dos casos (Buchy F, 2020). Contudo e, apesar de todas as evidências, a maioria das gestantes alcança proteção suficiente, independentemente do momento da vacinação (Cuningham, 2019).

Assim, a vacinação demonstrou produzir excelentes títulos de anticorpos protetores nas grávidas, diminuindo a incidência de complicações nos recém-nascidos (Nayak, 2016; Somerville, 2018). Para além de se verificar que, recém-nascidos de gestantes vacinadas tinham títulos de anticorpos mais elevados até aos 3 meses de idade, em comparação com recém-nascidos de gestantes não vacinadas (Buchy F, 2020).

Adicionalmente, deve-se ter em atenção que os antígenos e processos de fabricação da vacina variam consoante a época, assim como os riscos. Isto explica o elevado risco de parto prematuro em mulheres grávidas vacinadas, que se constatou unicamente na época 2009/2010, devido à vacina da gripe sazonal desse ano (Ahrens, 2014). Este risco aumentado foi observado quando duas vacinas da gripe foram disponibilizadas - a sazonal e a pandémica (pH1N1). A vacina pH1N1 foi administrada como uma vacina monovalente separada na época 2009/2010, sendo a partir daí combinada com a vacina sazonal. Nas grávidas que receberam apenas a vacina pH1N1 verificou-se uma diminuição do risco de parto prematuro, enquanto que nas que receberam a vacina da gripe sazonal e a vacina pH1N1 apresentaram um maior risco (Ahrens, 2014). Uma explicação para este aumento do risco de parto prematuro nas gestantes vacinadas com a vacina sazonal poderia ser a nova exposição a antígenos virais (Ahrens, 2014), uma vez que, a vacina da gripe geralmente varia em cada época gripal, quer em termos de antígenos que ela contém quer em termos dos processos usados para a sua produção (Louik, 2016). Facto que demonstra a extrema importância de monitorizar e avaliar a segurança da vacina em cada época gripal (Louik, 2016).

3.1. Eficácia da vacina da gripe

Um estudo realizado durante a pandemia de 2009, com a vacina da gripe A (pH1N1), revelou que a vacinação de mulheres grávidas reduziu o risco de infeção pelo vírus da gripe durante a gravidez em 70% (Buchy F, 2020).

Relativamente à IIV, diversos estudos relataram:

- Redução de aproximadamente 50% no risco de doença respiratória aguda associada à gripe entre mulheres grávidas, semelhante à proteção observada em todos os adultos durante a época de gripe (Thompson M, 2014);

- 40% de proteção contra a hospitalização associada à gripe durante a gravidez entre 2010-2016 (Thompson M, 2019);
- 28,9% das mulheres vacinadas no terceiro trimestre da gravidez tiveram significativamente menos problemas respiratórios (Buchy F, 2020);
- A eficácia da vacina da gripe foi de 63,9% em mulheres grávidas e 56,8% em recém-nascidos com idade inferior a 6 meses (Mølgaard-Nielsen D, 2019);
- Durante a época de gripe de 2013/2014, a vacinação preveniu 71% das infecções por gripe e 64% das hospitalizações em recém-nascidos com idade inferior a 6 meses (Dabrera G, 2014);
- Uma eficácia cumulativa, nos recém-nascidos de gestantes vacinadas durante o terceiro trimestre, de 67,9% após os primeiros 4 meses, diminuindo posteriormente (57,3% durante o quinto mês) (Nunes M, 2016b).

A IIV durante a gravidez tem sido associada a uma redução do risco de parto prematuro e de nascimento de neonatos com baixo peso ao nascer (Giles, 2019). A vacinação durante a gravidez mostrou também estar associada a um menor risco de morte fetal, independentemente do momento da vacinação durante a gravidez, embora não tenham chegado a uma conclusão definitiva (Zhang, 2018). Também foi demonstrada proteção parcial da vacina da gripe em mulheres grávidas infetadas pelo HIV, apresentando uma eficácia de 57,7% (Madhi S, 2014).

Um ECR da vacina da gripe, administrada entre 17-25 semanas ou 26-34 semanas de gravidez, demonstrou que a idade gestacional não afetou de modo significativo a eficácia da vacina (Katz J, 2018). O estudo também demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre as gestantes vacinadas precocemente e tardiamente em termos de baixo peso do recém-nascido, pequeno tamanho para a idade gestacional ou parto prematuro (Katz J, 2018).

Uma metanálise de quatro ECRs e cinco estudos observacionais constatou que, a vacinação contra a gripe durante a gravidez, reduziu nos recém-nascidos a infecção pelo vírus da gripe em 48% e o número de hospitalização associada à gripe em 72% (Nunes, 2018). Outros estudos realizados em países em desenvolvimento (Bangladesh, Nepal, Mali e África do Sul) relataram que a vacinação materna foi capaz de reduzir a infecção pelo vírus da gripe e os episódios graves de pneumonia em crianças (Omer S, 2018). Nos EUA, a eficácia da IIV administrada a mulheres grávidas foi de 45% a 92% na prevenção de hospitalizações sazonais em recém-nascidos com menos de 6 meses de idade (Buchy F, 2020).

3.2. Segurança da vacina da gripe

Os vários estudos sobre a vacinação contra a gripe durante a gravidez sugerem que esta não está associada a efeitos adversos na grávida ou no feto ([Chambers, 2016](#); [Fabiani, 2015](#); [Giles, 2019](#); [Jeong, 2019](#); [McMillan, 2015](#); [Thain S, 2019](#)). No entanto, alguns relataram resultados inconsistentes (negativos ou positivos) para cada um dos possíveis desfechos (parto prematuro, pequeno tamanho para a idade gestacional, baixo peso ao nascer, aborto espontâneo, malformações congénitas e morte fetal) ([Jeong, 2019](#)). Estes resultados inconsistentes devem-se, por vezes, à existência de numerosos fatores de confusão que podem aumentar o risco de efeitos adversos na gravidez, incluindo idade materna, tabagismo, histórico de parto prematuro, comprimento cervical curto, baixo status socioeconómico, uso de álcool ou drogas e doenças crónicas, como hipertensão, insuficiência renal ou diabetes ([McMillan, 2015](#)). Histórico de diversas doenças nos 12 meses anteriores ao início da gravidez (incluindo: doenças respiratórias, doenças cardiovasculares, doenças hematológicas, diabetes, doenças neuropsicológicas e obesidade) ou o consumo de certos medicamentos nos 6 meses antes do início da gravidez (como medicamentos para doenças respiratórias, doenças cardiovasculares, doenças neuropsicológicas, imunossuppressores, antidepressivos, contraceptivos hormonais, antibióticos e medicamentos relacionados à reprodução medicamente assistida), também foram consideradas condições pré-existentes de risco para a saúde, podendo contribuir para a existência de resultados falsos positivos ([Fabiani, 2015](#)).

Alguns estudos ainda demonstraram que, as mulheres grávidas que receberam a IIV tiveram um risco aumentado de aborto espontâneo dentro de um período de 28 dias após vacinação, mas apenas as grávidas que receberam uma vacina contendo a estirpe pandémica H1N1 (H1N1pdm09) na época anterior ([Buchy F, 2020](#); [Donahue, 2017](#); [Jeong, 2019](#)). Porém, não chegaram a resultados concretos de que a IIV causava aborto espontâneo, portanto os resultados não levaram a alterações nas recomendações relativamente à vacinação das mulheres grávidas ([Buchy F, 2020](#); [Jeong, 2019](#)).

Diversos estudos avaliaram os resultados obtidos em gestantes sujeitas à IIV ou contendo a estirpe pandémica H1N1pdm2009 comparativamente a mulheres não vacinadas, concluindo que:

- A vacina não está associada a um risco aumentado de efeitos adversos nos 42 dias após a vacinação, apoiando a segurança desta vacina para as grávidas.
- Não foram identificados efeitos adversos nem na mãe nem no recém-nascido ([Buchy F, 2020](#));

- Não existem evidências de que os efeitos adversos após a vacinação sejam mais comuns em mulheres grávidas, em comparação com mulheres não grávidas dentro da mesma faixa etária (Regan A, 2015);
- Efeitos adversos após a imunização de mulheres grávidas ocorrem com uma frequência semelhante à relatada em adultos saudáveis e são geralmente leves e autolimitados (Asavapiriyant S, 2018);
- Não há evidências de um risco aumentado de morte fetal associado à exposição da estirpe pandémica H1N1pdm2009 (Buchy F, 2020);
- A vacina contendo a estirpe pandémica H1N1pdm2009, está associada a uma diminuição do risco de parto prematuro e baixo peso ao nascer em 8% e 12%, respetivamente (Madhi, 2018).

Um ECR prospetivo assente em duas vacinas da gripe sazonal, inativadas e trivalentes, chegou a conclusões semelhantes (Munoz F, 2018). Assim sendo e, de acordo com a maioria dos estudos, é seguro dizer-se que as mulheres grávidas vacinadas tiveram menor probabilidade de contrair gripe e, portanto, tiveram melhores resultados na gravidez (incluindo nenhum risco aumentado de aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro ou restrição de crescimento fetal) (Buchy F, 2020; Chambers, 2016; Jeong, 2019; Louik, 2016). Adicionalmente, as vacinas também foram associadas a uma redução de 20% de doenças, como a pneumonia (Madhi, 2018).

Numerosos estudos que abordaram os riscos da IIV durante a gravidez consideram a vacina segura contudo, foram poucos os que avaliaram a vacinação no primeiro trimestre, um período em que o embrião é altamente vulnerável a teratogénicos e outros fatores – como: idade materna, tabagismo, uso de álcool ou drogas, doenças crónicas, entre outras comorbilidades (Donahue, 2017; Giles, 2019; McMillan, 2015). Contudo, considera-se a vacinação contra a gripe segura durante todos os estadios da gravidez, incluindo o primeiro trimestre (CDC, 2019h; Chalise U, 2019; Jeong, 2019; Somerville, 2018; Thain S, 2019; WHO, 2018b; Zhang, 2018). Não foram demonstrados efeitos adversos significativos a longo prazo (teratogénicos, carcinogénicos ou neurológicos) em gestantes que receberam a vacina da gripe durante o primeiro trimestre (e não seriam esperadas de uma vacina inativada) nem aumento na probabilidade de complicações fetais que pudessem estar correlacionadas com a administração da vacina (Somerville, 2018).

Adicionalmente, não foram observadas associações entre a vacinação contra a gripe e diabetes gestacional, hipertensão gestacional ou pré-eclâmpsia/eclâmpsia nas mulheres vacinadas (Tabela 4) (Buchy F, 2020; Somerville, 2018), contrariando estudos anteriores (Tabela 5) e deixando as gestantes mais seguras em relação à vacinação. Estas morbilidades,

como no caso da diabetes gestacional não controlada, podem levar a complicações não só para o feto – hiperinsulinismo/hiperglicagonemia, hipoglicemia, hipoxia fetal e alterações hormonais subjacentes – como para os recém-nascidos que têm um risco significativo de complicações a longo prazo (tais como diabetes tipo 2, síndrome metabólico, obesidade) (Trotta, 2014). Alguns estudos ainda mostraram um leve aumento no risco de malformações congénitas em mulheres grávidas que foram vacinadas (Chambers, 2016; Louik, 2016; Trotta, 2014; Zhang, 2018).

Hipóteses sobre a falta de imunogenicidade da vacinação contra a gripe quando administradas a mulheres grávidas não foram comprovadas (Somerville, 2018; Thompson M, 2014). Apesar de na gravidez haver um estado de tolerância imunológica relativa, foram detetados anticorpos protetores nas grávidas que receberam a IIV (Somerville, 2018). Nos primeiros meses de vida, o sistema imunológico dos recém-nascidos é incapaz de montar uma resposta totalmente protetora a muitos patógenos (Buchy F, 2020; Jones C, 2014). Durante esse período, os recém-nascidos dependem dos anticorpos, nomeadamente imunoglobulinas G (IgG), transferidos pela mãe e presentes no nascimento para a sua proteção contra muitas infeções (Buchy F, 2020). Isto vai de encontro às evidências dos benefícios adicionais fornecidos pela vacinação contra a gripe nas gestantes relativamente à proteção fornecida ao feto por transferência placentária de anticorpos protetores IgG fornecendo um suporte adicional à vacinação pré-natal (Cunningham, 2019; Madhi, 2018). Deste modo, o CDC (EUA) recomenda a vacina da gripe a todas as grávidas de forma a se protegerem a si mesmas e aos recém-nascidos até aos 6 meses de idade após o nascimento (CDC, 2020b), através da transferência transplacentária de anticorpos protetores, uma vez que, as vacinas da gripe não estão atualmente licenciadas para uso em crianças com menos de 6 meses de idade (Buchy F, 2020; Nayak, 2016).

Tabela 4: Resumo dos estudos de grávidas vacinadas contra a gripe avaliando a segurança e/ou eficácia.

País	Ano	Nº de amostras	Tipo(s) de vacina	Resultado/ Eficácia da vacina	Conclusão
Austrália	2012/ 2013	5076	IIV Trivalente	Morte fetal	Morte fetal 51% menos provável entre vacinados
EUA	2010/ 2011	1616	IIV Trivalente	Hipertensão gestacional; Pré-eclâmpsia; Diabetes gestacional	Nenhuma associação entre vacinação e resultados maternos
EUA	2003/ 2008	8864	IIV Trivalente	Hipertensão gestacional; Pré-eclâmpsia; Diabetes gestacional	Sem aumento de malformações. Diminuição significativa de morte fetal ou parto prematuro
Suécia	2009/ 2010	41183	H1N1 Monovalente com adjuvante ASO ₃	Morte fetal, até 6 dias após nascimento ou até aos 4 anos	Nenhum aumento do risco de morte fetal, morte neonatal precoce ou morte tardia
Finlândia	2009/ 2010	34241	H1N1 Monovalente com adjuvante ASO ₃	Morte fetal; Parto prematuro; Baixo peso ao nascer	Nenhuma associação entre efeitos adversos na gravidez e vacinação materna
África do Sul	2011/ 2012	2116 HIV+ 194 HIV-	IIV Trivalente	Resposta imune (teste HI na mãe e no bebé); Resultados de segurança: aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro e peso ao nascer	HIV-: EV 50,4% mãe e 48,8% bebé; HIV+: EV 57,7% mãe e 26,7% bebé; Nenhuma diferença significativa nas taxas de aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro ou peso ao nascer
No Mundo	1981/ 2014	>660000	IIV Monovalente /Trivalente	Morte fetal ou nascimento prematuro	Nenhuma evidência forte indicando aumento do risco de morte fetal ou parto prematuro

EV: Eficácia da Vacina; **IIV:** Vacina Inativa da Gripe

Adaptado de: (Somerville, 2018)

Tabela 5: Desfechos observados entre mulheres grávidas vacinadas e não vacinadas.

	Não vacinadas N (%)	Vacinadas N (%)
	23987	6131
Resultados na gestante		
Pré-eclâmpsia/eclâmpsia	715 (3,0)	219 (3,6)
Diabetes gestacional	444 (1,9)	144 (2,3)
Morte materna	0	0
Admissão na UCI	42 (0,2)	10 (0,2)
Parto espontâneo	16003 (66,7)	4107 (67,0)
Resultados fetais e perinatais		
Natimorto	58 (0,2)	16 (0,3)
Morte perinatal	77 (0,3)	21 (0,3)
Resultados no recém-nascido		
Pequeno para a idade gestacional	2307 (9,6)	562 (9,2)
Morte do recém-nascido	19 (0,1)	5 (0,1)
Admissão do recém-nascido na UCI	492 (2,1)	146 (2,4)
Reanimação do recém-nascido	203 (0,8)	58 (0,9)
Malformações congénitas:	945 (3,9)	276 (4,5)
Sistema nervoso	45 (0,2)	13 (0,2)
Olhos	8 (0,03)	3 (0,05)
Orelhas, cara e pescoço	27 (0,1)	10 (0,1)
Cardiopatias congénitas	351 (1,5)	110 (1,8)
Respiratória	13 (0,1)	7 (0,1)
Sistema digestivo	74 (0,3)	23 (0,4)
Urinária	128 (0,5)	32 (0,5)
Defeitos na parede abdominal	2 (0,01)	2 (0,03)
Genital	6 (0,03)	0
Membros	288 (1,2)	80 (1,3)
Outras anomalias	24 (0,1)	8 (0,1)

Adaptado de: (Trotta, 2014)

Outro mecanismo envolvido na transferência de proteção ao recém-nascido é o leite materno. As mulheres vacinadas durante a gravidez apresentam níveis de anticorpos, nomeadamente IgA, mais elevados e com atividade neutralizante contra o vírus da gripe, para além de tornar a grávida menos suscetível à infeção pelo vírus (Madhi, 2018). Estes

níveis de IgA permanecem elevados até 6 meses após o parto e mostram o quanto a vacinação pode ter benefícios ainda maiores para o recém-nascido, no caso deste receber leite materno nos primeiros meses de vida ([Bricks, 2016](#)).

Em alguns estudos com a IIV, verificou-se que esta pode reduzir até 50% o risco de doença respiratória aguda associada à infecção pelo vírus da gripe nas grávidas ([Bricks, 2016](#); [Somerville, 2018](#)). Porém, existem evidências contrárias quanto à existência de proteção cruzada contra os tipos, subtipos e linhagens de vírus da gripe não contidos na vacina ([Somerville, 2018](#)).

Curiosamente, o tiomersal, um conservante derivado do mercúrio, é utilizado como conservante em apresentações multidosas da vacina da gripe, com o objetivo de impedir o crescimento de contaminantes microbianos durante o seu armazenamento e uso ([WHO, 2011](#)). Nos últimos anos foram-se levantando preocupações sobre a segurança das vacinas que continham tiomersal. Até ao momento, não há evidências científicas de que essas vacinas possam ter qualquer risco para a gravidez ou recém-nascido e a OMS continua a recomendar o uso destas vacinas porque os benefícios do uso de tiomersal supera qualquer risco teórico de toxicidade ([WHO, 2020b](#)). Quanto ao adjuvante ASO₃, nenhuma das vacinas da gripe o contém atualmente, já que foi associado com o aumento da incidência de narcolepsia/cataplexia, quando presente nas formulações das vacinas utilizadas nos países nórdicos durante o período pandémico de 2009 ([WHO, 2012a](#)). Uma outra contraindicação à imunização é a ocorrência de alergia à proteína do ovo após uma dose prévia da vacina ([Nayak, 2016](#)). Isto porque, atualmente, a maioria das vacinas da gripe são produzidas através de um processo de fabricação baseado em ovos embrionados, portanto, podem conter quantidades vestigiais de proteína do ovo, nomeadamente ovalbumina. Para contornar este possível obstáculo à imunização, já existem vacinas da gripe licenciadas que são fabricadas em culturas celulares ([CDC, 2019c](#)).

Revisões sistemáticas que visaram a segurança da administração da vacina da gripe na gravidez destacam que esta pode ser administrada com segurança e eficácia durante qualquer trimestre da gravidez e que nenhum estudo até o momento demonstrou um risco aumentado de complicações maternas ou efeitos adversos no feto associados à IIV ([Bratton K, 2015](#); [Buchy F, 2020](#); [Fell D, 2015](#); [McMillan, 2015](#); [Nunes M, 2016a](#); [Polyzos, 2015](#)). De forma semelhante, a OMS concluiu que não foram observados efeitos adversos durante e/ou após a gravidez com vacinas da gripe, que continham ou não adjuvantes ([WHO, 2014](#)).

3.3. Recomendações e diretrizes a favor da imunização materna

A OMS emite recomendações globais acerca da vacinação das grávidas contra a gripe que são adaptadas por diversos países com base em informações locais sobre grupos de risco, carga global da doença e relação custo-benefício (WHO, 2012a). Contudo, é importante ressaltar que podem existir contradições (entre diretrizes nacionais e internacionais, recomendações e rótulos de vacinas) que podem fazer com que as mensagens sobre a vacinação das grávidas pareçam ambíguas para os profissionais de saúde e para o público (Regan A, 2016).

Em 2012, a OMS recomendou que todas as mulheres grávidas em todo o mundo recebessem a vacinação contra a gripe, independentemente do estadio da gravidez, e fossem consideradas como um grupo de maior prioridade nos programas sazonais de vacinação contra a gripe (WHO, 2012a). Na Tabela 6 são apresentadas algumas das recomendações feitas por uma seleção de autoridades em todo o mundo (Buchy F, 2020). Verificou-se que a inclusão de mulheres grávidas nos programas de vacinação contra a gripe é mais provável em países de rendimento médio-alto (Ortiz J, 2016).

O ACIP e a ACOG recomendam que mulheres grávidas durante a época de gripe recebam a IIV assim que esta esteja disponível. Acrescentam ainda que qualquer vacina da gripe inativada, apropriada para a idade, licenciada e recomendada, pode ser administrada com segurança durante qualquer um dos três trimestres da gravidez. Recomendam também que os profissionais de saúde aconselhem as mulheres grávidas sobre a segurança e benefícios da imunização contra gripe para si e para o feto e, evidenciem os benefícios da imunização materna na transmissão da imunidade passiva para o recém-nascido (ACOG, 2018; Buchy F, 2020).

Uma extensa revisão realizada pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC) concluiu que, a vacinação de mulheres grávidas pode reduzir o número de hospitalizações e mortes relacionadas com a gripe e potencialmente reduzir a taxa de gripe em crianças com idade inferior a 6 meses, para quem a vacinação contra a gripe não é indicada (Buchy F, 2020).

Tabela 6: Recomendações da vacina da gripe durante a gravidez.

Organização	Recomendação da vacina da gripe
OMS (Organização Mundial da Saúde)	Recomendada a todas as mulheres grávidas, independentemente do estadio da gravidez
ACOG (Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas)	Recomendada a todas as mulheres grávidas
CDC (Centro de Controlo e Prevenção de Doenças dos EUA)	Recomendada a todas as mulheres grávidas
NICD (Instituto Nacional de Doenças Transmissíveis da África do Sul)	Recomendada a todas as mulheres grávidas em todas as fases da gravidez, incluindo o período pós-parto
NACI (Comité Consultivo Nacional de Imunização do Canadá)	Recomendada a todas as mulheres grávidas
JNC (Centro Nacional de Saúde e Desenvolvimento Infantil do Japão)	Recomendada a todas as mulheres grávidas
ECDC (Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças)	Recomendada a mulheres grávidas saudáveis no segundo e terceiro trimestres
ATAGI (Grupo Consultivo Técnico Australiano de Imunização)	Recomendada fortemente às mulheres grávidas em cada gravidez

Adaptado de: (Buchy F, 2020)

3.4. Barreiras e soluções para melhorar a adesão à imunização materna

Apesar das recomendações e diretrizes das diversas organizações (OMS, ACIP, ACOG) de que todas as mulheres grávidas ou as que planeiam engravidar devem ser vacinadas contra a gripe antes ou durante a época da gripe, independentemente da idade gestacional, a taxa de adesão da vacina continua muito variada (entre 4% e 93%) (Buchy F, 2020; Jeong, 2019; McMillan, 2015). As barreiras à imunização materna são multifatoriais e incluem fabricantes de vacinas, profissionais de saúde, mulheres grávidas e a sociedade em geral (ver Tabela 7) (Buchy F, 2020).

Tabela 7: Barreiras à imunização materna contra a gripe.

	Exemplo
Fabricantes	▪ Relutância dos fabricantes em desenvolver, testar em ECR e comercializar vacinas para mulheres grávidas (Jones C, 2014) ▪ Barreiras regulatórias (rotulagem de informações do produto)
Profissionais de saúde	▪ Má sensibilização dos profissionais de saúde (Koul P, 2018) ▪ Falha em oferecer vacinação contra a gripe a mulheres grávidas (Jones C, 2014; Prospero E, 2019) ▪ Relutância dos profissionais de saúde que normalmente não administram vacinas (por exemplo, parteiras) a mulheres grávidas (Prospero E, 2019) ▪ Falta de recomendações claras e fortes das autoridades de saúde (Prospero E, 2019) ▪ Logística de aquisição, armazenamento, administração e rastreamento de vacinas (Koul P, 2018) ▪ Barreiras financeiras (como, reembolso inadequado) ▪ Falta de diretrizes nacionais (Li R, 2018)
Mulheres grávidas	▪ Preocupações com a segurança e o bem-estar do feto ▪ Objeções a medicamentos na gravidez (Prospero E, 2019) ▪ Falta de conhecimento sobre a gravidade da gripe (Prospero E, 2019) ▪ Falta de consciência do efeito benéfico da vacinação (Koul P, 2018; Li R, 2018)
Sociedade	▪ Normas sociais (Prospero E, 2019) ▪ Opiniões de familiares e amigos (Prospero E, 2019) ▪ Má assistência pré-natal ▪ Baixa renda e alta paridade

Adaptado de: (Buchy F, 2020)

Em Portugal, muitas destas barreiras foram ultrapassadas tendo sido aplicadas medidas por forma a aumentar a adesão à vacinação contra a gripe, incluindo (DGS, 2015, 2019):

- Vacinação contra a gripe gratuita para todos os indivíduos considerados grupo de risco ou que apresentem alguma das patologias apresentadas na Tabela 1;
- Existem diretrizes nacionais fornecidas pela Direção Geral de Saúde (DGS);
- Sensibilização dos profissionais de saúde;
- Recomendações claras sobre a vacina da gripe aos profissionais de saúde e à população em geral por parte da DGS;
- Boa assistência pré e pós-natal.

Como referido anteriormente, diversos estudos demonstraram que as mulheres grávidas que recebem recomendação de um profissional ou a oferta de vacinação, apresentam uma maior taxa de adesão à vacinação (Chalise U, 2019; Yuen C, 2014). Isto vem alertar sobre a necessidade de se encontrarem soluções para melhorar a adesão das gestantes à vacinação

contra a gripe. Soluções essas que, requerem uma combinação entre reforma regulatória, melhor acessibilidade à vacina, educação dos pacientes e profissionais de saúde sobre os benefícios de vacinação, conforme descrito na Tabela 8 (Buchy F, 2020).

Tabela 8: Soluções para melhorar a imunização materna contra a gripe.

	Exemplo
Processos regulatórios	▪ Processos aprimorados para o desenvolvimento, aprovação e rotulagem de vacinas para mulheres grávidas (Vojtek I, 2018)
Acessibilidade da vacina	▪ Localização conveniente dos locais de vacinação ▪ Vacinação disponível nas clínicas pré-natais ▪ Vacinação gratuita
Profissionais de saúde	▪ Recomendarem a vacinação a mulheres grávidas (Wilson R, 2015) ▪ Gestantes com consultas presenciais com os profissionais de saúde ▪ Divulgação de informação sobre a vacinação contra a gripe
Educação sobre os benefícios da vacinação pré-natal contra a gripe	▪ Melhor conscientização da imunização materna entre os profissionais de saúde (Maltezou H, 2019) ▪ Educação das gestantes acerca dos benefícios da vacinação pré-natal (Vojtek I, 2018)
Abordagens multicanal	▪ Governos dispostos a investir e apoiar a prevenção por vacinação ▪ Campanhas de conscientização da comunidade ▪ Programas comunitários de farmácia, esquemas de incentivo e reforço positivo dos profissionais de saúde ▪ Consciência sobre os benefícios e segurança da vacina (Wilcox C, 2018) ▪ Estratégia para combater a recusa de vacinas ▪ Conhecimento da epidemiologia local das doenças, envolvimento do consumidor, acesso equitativo à vacinação materna e avaliação de programas e monitorização de segurança (Krishnaswamy S, 2019) ▪ Lembretes sobre a vacinação nos registos de saúde pré-natal, educação e fornecimento de informações para profissionais de saúde e pacientes (Bisset K, 2018)

Adaptado de: (Buchy F, 2020)

4. RISCO DE MALFORMAÇÃO FETAL?

Uma malformação congénita é um defeito estrutural ou funcional, de origem pré-natal, presente no momento do nascimento, morte fetal ou no útero, para além de afetar (ou ter propensão a afetar) a saúde, a sobrevivência ou o funcionamento físico e/ou cognitivo do recém-nascido (DeSilva, 2016). Adicionalmente, o risco de malformação congénita diminui com o aumento da idade gestacional, como se pode observar na Tabela 9.

Tabela 9: Risco de malformações congénitas em função da idade gestacional.

Idade gestacional	Risco de malformação congénita
0 – 13 Semanas	Elevado
14 – 20 Semanas	Baixo
≥ 20 Semanas	Improvável

Adaptado de: (DeSilva, 2016)

Como referido anteriormente, as malformações congénitas abrangem uma ampla variedade de anormalidades estruturais e funcionais que podem ocorrer isoladamente ou como um grupo de defeitos (DeSilva, 2016). No caso das anomalias estruturais, são frequentemente devidas a erros na embriogénese, que ocorrem durante o primeiro trimestre de gestação. O primeiro trimestre é o período mais crítico para a exposição a teratogénicos durante a gravidez no que diz respeito aos efeitos subsequentes no desenvolvimento fetal. Contudo, os períodos críticos de exposição durante a gravidez podem variar de acordo com o sistema orgânico ou o tipo de anomalia (DeSilva, 2016).

O feto em desenvolvimento está exposto a um maior risco de malformações congénitas durante o primeiro trimestre, pelo que, devemos ter em atenção todos os fatores que possam estar envolvidos (e não apenas a toma da vacina da gripe ou não), tais como idade materna, IMC materno, ser fumadora, entre outros (Ludvigsson, 2016; McMillan, 2015).

Embora a maioria dos estudos tenham reportado não haver qualquer associação entre a vacinação contra a gripe e a ocorrência de malformações fetais (Bratton K, 2015; Buchy F, 2020; Fell D, 2015; McMillan, 2015; Nunes M, 2016a; Polyzos, 2015), outros estudos apresentaram resultados contraditórios e evidenciaram malformações a nível cardíaco e dos membros (Conlin, 2018; Fabiani, 2015; Trotta, 2014). Porém, como os resultados se encontravam no limite para ter significância e os estudos em causa assentavam na vacinação durante o segundo e terceiro trimestre – o que não seriam etiológicamente relacionados a defeitos congénitos, uma vez que a organogénese ocorre no primeiro trimestre – concluiu-

se não haver uma associação significativa entre defeitos congénitos e a vacina da gripe (Conlin, 2018).

Nos estudos que visaram o efeito da vacina da gripe em mulheres no primeiro trimestre da gravidez, principalmente durante as primeiras 8 semanas de gestação (período correspondente à blastogénese e organogénese) verificou-se que esta não estava associada a um risco aumentado de malformações congénitas (CDC, 2019h; Chalise U, 2019; Jeong, 2019; Somerville, 2018; Thain S, 2019; WHO, 2018b; Zhang, 2018). Mesmo com a exclusão de possíveis fatores que pudessem levar a resultados falsos positivos, como gestantes com diagnóstico de comorbilidade antes da vacinação – o que permite determinar se as comorbilidades anteriores influenciam o aumento do risco de malformações congénitas após a exposição à vacina no início da gravidez – e tendo em consideração os fatores familiares (usando também irmãos como comparação para minimizar a influencia de confusão familiar), obteve-se o mesmo resultado (Ludvigsson, 2016). Contudo, neste último caso, não foi possível descartar totalmente o aumento de risco para malformações específicas, principalmente a nível cardíaco, fenda oral ou deficiência de membros, como podemos ver pelas Tabelas 10, em que os limites superiores no intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram de 0,43%, 0,21% e 0,07%, respetivamente, nas grávidas vacinadas contra a gripe nas primeiras 8 semanas de gestação (Ludvigsson, 2016). Além disso, os resultados obtidos neste estudo não sugerem um risco aumentado para qualquer malformação nas primeiras 8 a 14 semanas de gravidez, porém não foi possível excluir um aumento do risco de até 6 malformações congénitas por 1.000 gestantes (0,6%) expostas à vacina da gripe durante o primeiro trimestre (Ludvigsson, 2016).

Outros estudos, que também investigaram o risco de malformações em gestantes vacinadas durante o primeiro trimestre quando aplicada a vacina da gripe monovalente A(H1N1)2009, mas também quando esta continha adjuvantes (como o AS03), chegaram à mesma conclusão, que a vacina da gripe, monovalente com ou sem adjuvantes, não estava associada a um risco aumentado de malformações (DeSilva, 2016; McMillan, 2015). Porém, apresentaram alguns resultados em que houve um risco de malformações fetais em mulheres vacinadas que não foi visível em mulheres não vacinadas. Os resultados destes estudos podem ser observados na Tabela 11, onde se verificam alguns estudos com relação positiva entre a vacina da gripe e o risco de malformações, isto é, com *odds ratio* (OR) superior 1. Quando não há relação entre a vacina da gripe e o risco de malformação congénita o OR é igual ou inferior a 1 (McMillan, 2015).

Tabela 10: Vacinação contra a gripe durante a gravidez e riscos absolutos para a malformação.

Malformação	Vacinação	Risco absoluto (IC95%), %	Diferença de risco (IC95%), %
Qualquer malformação congénita			
≤8 Semanas	Não	4,96 (4,82 a 5,10)	-
	Sim	5,06 (4,57 a 5,56)	0,10 (-0,41 a 0,62)
Primeiro trimestre	Não	4,94 (4,80 a 5,09)	-
	Sim	5,11 (4,75 a 5,47)	0,16 (-0,23 a 0,56)
Gravidez completa	Não	4,96 (4,78 a 5,14)	-
	Sim	4,98 (4,77 a 5,19)	0,02 (-0,26 a 0,30)
Doença cardíaca congénita			
≤8 Semanas	Não	1,64 (1,56 a 1,72)	-
	Sim	1,76 (1,47 a 2,06)	0,12 (-0,18 a 0,43)
Primeiro trimestre	Não	1,63 (1,54 a 1,71)	-
	Sim	1,79 (1,57 a 2,00)	0,16 (-0,07 a 0,40)
Gravidez completa	Não	1,66 (1,55 a 1,76)	-
	Sim	1,64 (1,52 a 1,76)	-0,02 (-0,18 a 0,14)
Deficiência de membros			
≤8 Semanas	Não	0,05 (0,03 a 0,06)	-
	Sim	0,06 (0,01 a 0,12)	0,02 (-0,04 a 0,07)
Primeiro trimestre	Não	0,05 (0,03 a 0,06)	-
	Sim	0,06 (0,02 a 0,10)	0,01 (-0,03 a 0,05)
Gravidez completa	Não	0,05 (0,03 a 0,07)	-
	Sim	0,05 (0,03 a 0,07)	-0,01 (-0,03 a 0,02)
Fenda oral			
≤8 Semanas	Não	0,15 (0,13 a 0,18)	-
	Sim	0,25 (0,14 a 0,36)	0,10 (-0,02 a 0,21)
Primeiro trimestre	Não	0,16 (0,13 a 0,18)	-
	Sim	0,17 (0,10 a 0,24)	0,01 (-0,06 a 0,09)
Gravidez completa	Não	0,17 (0,13 a 0,20)	-
	Sim	0,15 (0,11 a 0,19)	-0,02 (-0,07 a 0,03)

Adaptado de: (Ludvigsson, 2016)

Noutro estudo são relatadas também malformações nos fetos de mulheres grávidas vacinadas, não detetadas em grávidas não vacinadas (Tabela 11) (Mackenzie I, 2012). Contudo, as evidências não foram suficientemente fortes para permitir associar a vacina da gripe ao risco de desenvolvimento de malformações congénitas, não só devido ao facto dos

resultados apresentados partirem de análises não ajustadas (McMillan, 2015), mas também devido ao baixo número de amostras, à possibilidade de existirem interferências nos resultados e à perda da associação positiva entre malformação e vacinação (Ludvigsson, 2016). Estudos em que foram realizadas análises ajustadas para eliminar riscos de confusão chegaram à conclusão que a vacina da gripe não está associada com a ocorrência de malformações no feto (McMillan, 2015).

Tabela 11: Resultado de malformações congénitas quando aplicada a vacina da gripe monovalente H1N1, com ou sem adjuvante, no primeiro trimestre de gravidez *versus* nenhuma vacina.

Estudos	Adjuvante	Vacinadas	Controlo	Estimativa	Malformação
(Chambers C, 2013)	Inespecífica	328	188	OR 0,79	Estenose pilórica hipertrófica; Agenesia renal; Estenose pulmonar; Deficiência proximal do fémur; Defeito do septo ventricular; Pé torto bilateral
(Kallen B, 2012)	ASo3	3165	84484	OR 1,04	Defeitos cardiovasculares congénitos; Defeitos do septo ventricular e atrial; Malformação ocular; Fendas orofaciais; Hipospádia
(Mackenzie I, 2012)	ASo3	19	13	OR 2,18	Hipospádia; Hidrocefalia; Hérnia umbilical; Fenda palatina; Marca de pele no dedo
(Oppermann M, 2012)	Sem ou ASo3	70	1198	OR 0,99	Defeito do septo atrial e ventricular; Pé torto bilateral; Anencefalia; Extrofia da bexiga; Displasia do quadril; Macrocefalia; Testículo não descido

Adaptado de: (McMillan, 2015)

Estudos baseados na vacina da gripe contendo o adjuvante MF59, também não mostraram um aumento estatisticamente significativo do risco de efeitos adversos associados à sua administração durante segundo ou terceiro trimestre de gestação - identificaram 284/6246 (4,5%) casos de malformações congénitas nas gestantes imunizadas e 3246/79925 (4,1%) casos nas gestantes não imunizadas (DeSilva, 2016; Fabiani, 2015). Porém, foi observado um aumento do risco de malformações congénitas dos membros e defeitos cardíacos congénitos, em recém-nascidos de mulheres vacinadas (Fabiani, 2015). No entanto, são necessários estudos adicionais, projetados especificamente para avaliar o risco de malformações congénitas específicas e com base num tamanho adequado de amostras, de forma a avaliar melhor se os resultados foram apenas por acaso ou refletem uma diferença significativa (Fabiani, 2015). Adicionalmente, a vacina da gripe com o adjuvante MF59, não revelou aumentar o risco de efeitos adversos, mostrando um perfil de tolerabilidade e segurança muito semelhante ao das vacinas da gripe sazonais sem adjuvantes (Fabiani, 2015).

Contudo, alguns estudos mostraram um potencial aumento do risco de malformações congénitas para o feto após a vacinação contra a gripe durante qualquer período da gravidez (Chambers, 2016; Louik, 2016; Trotta, 2014; Zhang, 2018) (mesmo que os valores estivessem no limite de significância) (ver Tabela 5), principalmente quando a vacina é administrada no primeiro trimestre (Tabela 12). As anormalidades cardíacas foram o tipo de malformação mais comum, seguido de malformações nos membros e anormalidade do sistema uretral (Trotta, 2014; Zhang, 2018). Apesar dos estudos assentes na vacina trivalente serem reduzidos (uma vez que a maioria assenta na vacina monovalente H1N1 2009), verificaram-se taxas de defeitos congénitos em recém-nascidos de grávidas expostas à vacina trivalente semelhantes aos referidos anteriormente (Polyzos, 2015). Estes estudos demonstraram um risco modestamente elevado (de 1,87) para os defeitos congénitos em geral, com a exposição da grávida à IIV no primeiro trimestre (Chambers, 2016). No entanto, quando estes resultados foram sujeitos ao Sistema de Vigilância de Vacinas e Medicamentos na Gravidez (VAMPSS), um programa de pesquisa desenvolvido especificamente para avaliar medicamentos e vacinas usados por mulheres grávidas, esse risco não se verificou (Chambers, 2016; Louik, 2016).

Adicionalmente, a administração da vacina da gripe H1N1 durante a fase inicial da gravidez – o momento mais relevante em relação às exposições potencialmente teratogénicas - não foi associada a um risco aumentado de anomalias congénitas (Zhang, 2018).

Tabela 12: Tipos de malformações congénitas após administração da vacina da gripe monovalente H1N1.

Parâmetros	2014	2012*	2013*	2014*	Número Total
Nº vacinação	6246	3165	328	246	9985
Nº malformações congénitas	300	110	9	9	428
Sistema nervoso	14	0	0	0	14
Olhos	3	7	0	0	10
Orelhas, cara e pescoço	10	0	0	0	10
Defeitos congénitos do coração	113	88	2	1	204
Respiratório	7	0	0	0	7
Fendas orofaciais	4	5	0	0	9
Sistema digestivo	23	0	2	0	25
Defeitos da parede abdominal	2	0	0	0	2
Urinário	34	10	1	4	49
Genital	0	0	0	0	0
Membros	82	0	2	0	84
Outras anomalias/síndromes	8	0	1	3	12
Cromossomal	0	0	1	1	2

* Vacinação durante o primeiro trimestre

Adaptado de: (Zhang, 2018)

Com base nas evidências apresentadas nos diversos estudos e, tendo em conta que não se limitaram apenas a avaliar o risco de malformações congénitas com ou sem exposição da gestante à vacina da gripe, como a excluir possíveis fatores que pudessem levar a confusão dos resultados, é possível excluir um possível aumento do risco de malformações congénitas após a vacinação contra a gripe. Todos estes estudos vêm então reforçar as recomendações da OMS para que todas as mulheres grávidas ou aquelas que planeiam engravidar sejam vacinadas contra a gripe, independentemente da idade gestacional (Kharbanda, 2017; WHO, 2018b).

5. CONCLUSÃO

A gripe representa uma das principais causas de morte no mundo (WHO, 2018b). Em particular, crianças, jovens, idosos, indivíduos com comorbidades, mulheres grávidas e profissionais de saúde são grupos com maior risco de infecção pelo vírus da gripe (Restivo, 2018). A infecção pelo vírus da gripe durante a gravidez causa morbidade, mortalidade significativa e impacto social e económico substancial (WHO, 2018b). Este aumento do risco é devido à interação complexa de alterações anatómicas, fisiológicas e imunológicas que ocorrem durante qualquer gravidez normal (Somerville, 2018). Em todo o mundo, a vacinação constitui a única estratégia reconhecida para prevenir a infecção pelo vírus da gripe, bem como a sua transmissão (Restivo, 2018).

Na última década, um grande número de estudos tem vindo a investigar não só a segurança da vacina da gripe na gravidez, mas também os possíveis efeitos adversos a curto ou longo prazo para o feto. Os resultados têm sido tranquilizadores e não há evidências de um risco aumentado de efeitos adversos após a vacinação contra o vírus da gripe na gravidez (Chambers, 2016; Fabiani, 2015; Giles, 2019; McMillan, 2015; Thain S, 2019). Os estudos têm mostrado que a administração da vacina durante a gravidez reduz efetivamente o risco de morte fetal, a principal complicação associada à infecção pelo vírus da gripe (Zhang, 2018), bem como o risco de parto prematuro, peso do neonato (com peso abaixo do percentil 10) para a idade gestacional ou aborto espontâneo (Madhi, 2018). Foi também demonstrado que, a vacinação durante o início da gravidez não está associada a um risco aumentado de anomalias congénitas (Conlin, 2018; DeSilva, 2016; Fabiani, 2015; Jeong, 2019; Kharbanda, 2017; Ludvigsson, 2016; McMillan, 2015; Zhang, 2018). As evidências e metodologias disponíveis têm melhorado ao longo dos anos, permitindo chegar a uma conclusão segura (Kharbanda, 2017).

Todas as vacinas da gripe sazonal após a época de 2009-2010 começam a incluir a estirpe pandémica H1N1 de 2009, pelo que a avaliação da sua segurança continua a ser importante. Estudos sobre a segurança e eficácia das vacinas da gripe continuam a confirmar que a proteção fornecida pela vacinação supera quaisquer riscos potenciais para a mãe e/ou o feto (CDC, 2019h; Conlin, 2018). Diversos estudos têm demonstrado também benefícios adicionais obtidos através da vacinação materna, incluindo a proteção conferida ao feto pelos anticorpos maternos que resultam da transferência placentária, fornecendo um suporte adicional à vacinação pré-natal (CDC, 2019h; Cunningham, 2019).

A segurança e eficácia das vacinas da gripe durante a gravidez têm vindo a ser estudadas exaustivamente, e há fortes evidências que permitem considerar a administração da IIV a forma mais segura e eficaz de prevenção da infecção tanto para as gestantes como para o feto,

podendo ser administrada em qualquer trimestre (de acordo com o ACIP e o ACOG) (Cunningham, 2019). Segundo a OMS e o CDC (EUA) as gestantes devem ser priorizadas para vacinação (CDC, 2019h; WHO, 2018b).

Recomendações nacionais e da OMS para o uso da IIV durante a gravidez, bem como a recomendação de profissionais de saúde ou a vacinação gratuita, têm contribuído para um aumento da adesão à vacinação (DGS, 2019; WHO, 2018b). Contudo, continua a ser necessário implementar outras estratégias para aumentar a adesão das gestantes à vacina da gripe.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOG, (American College of Obstetricians and Gynecologists). ACOG committee opinion no. 732: influenza vaccination during pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. 2018;131(4):109-14.
- Ahrens K, Louik C, Kerr S, Mitchell A, Werler M. Seasonal influenza vaccination during pregnancy and the risks of preterm delivery and small for gestational age birth. *Paediatric And Perinatal Epidemiology*. 2014;28(6):498-509.
- Asavapiriyant S, Kittikraisak W, Suntarattiwong P, Ditsungnoen D, Kaoiean S, Phadungkiatwatana P, Srisantiroj N, Chotpitayasunondh T, Dawood F, Lindblade K. Tolerability of trivalent inactivated influenza vaccine among pregnant women, 2015. *BioMed Central - Pregnancy and Childbirth*. 2018;18(1):110-7.
- Bisset K, Paterson P. Strategies for increasing uptake of vaccination in pregnancy in high-income countries: a systematic review. *Vaccine*. 2018;36(20):2751-9.
- Bratton K, Wardle M, Orenstein W, Omer S. Maternal influenza immunization and birth outcomes of stillbirth and spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(5):11-9.
- Bricks L, Ribeiro A, Domingues C, Pereira S, Carvalhanas T, Moraes J. Influenza vaccine in pregnant women: what's new? *Journal Of Health & Biological Sciences*. 2016;4(1):30-7.
- Buchy F, Badur S, Kassianos G, Preiss S, Tame J. Vaccinating pregnant women against influenza needs to be a priority for all countries: An expert commentary. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;92:1-12.
- Callaghan W, Creanga A, Jamieson D. Pregnancy - Related Mortality Resulting From Influenza in the United States During the 2009–2010 Pandemic. *Obstetrics & Gynecology*. 2016;126(3):486-90.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). 2009 H1N1 Pandemic Timeline. 2019a.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). 2019-20 Summary of Recommendations: Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) - United States, 2019-20. 2019b.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Flu Vaccine and People with Egg Allergies. 2019c.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Flu Vaccine With Adjuvant. 2019d.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). How is pandemic Flu different from seasonal Flu? 2019e.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Influenza Historic Timeline. 2019f.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Key Facts About Influenza (Flu). 2019g.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Pregnant Women & Influenza (Flu). 2019h.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Types of Influenza Viruses. 2019i.

CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). What You Should Know About Flu Antiviral Drugs. 2019j.

CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Influenza Antiviral Medications: Summary for Clinicians. 2020a.

CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). Key Facts About Seasonal Flu Vaccine. 2020b.

CDC, Prevention) CfDCa. Antigenic Characterization. 2019k.

Chalise U, McDonald J, Amatya A, Morales M. Seasonal Influenza Vaccination Patterns Among Pregnant Women in New Mexico. *Hispanic Health Care International*. 2019;1-10.

Chambers C, Johnson D, Xu R, Luo Y, Louik C, Mitchell A, Schatz M, Jones K. Risks and safety of pandemic H1N1 influenza vaccine in pregnancy: birth defects, spontaneous abortion, preterm delivery, and small for gestational age infants. *Vaccine*. 2013;31(44):5026-32.

Chambers C, Johnson D, Xu R, Luo Y, Louik C, Mitchell A, Schatz M, Jones K, Otis Collaborative Research Group. Safety of the 2010-11, 2011-12, 2012-13, and 2013-14 seasonal influenza vaccines in pregnancy: Birth defects, spontaneous abortion, preterm delivery, and small for gestational age infants, a study from the cohort arm of VAMPSS. *Vaccine*. 2016;34(37):4443-9.

Chaves S, Perez A, Farley M, Miller L, Schaffner W, Lindegren M, Sharangpani R, Meek J, Yousey-Hindes K, Thomas A, Boulton R, Baumbach J, Hancock E, Bandyopadhyay A, Lynfield R, Morin C, Zansky S, Reingold A, Bennett N, Ryan P, Fowler B, Fry A, Finelli L. The burden of influenza hospitalizations in infants from 2003 to 2012, United States. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2014;33(9):912-9.

Conlin A, Bukowinski A, Levine J, Khodr Z, Kaur N, Farrish S, Sevic C. A follow-up comparative safety analysis of pandemic H1N1 vaccination during pregnancy and risk of infant birth defects among U.S. military mothers. *Vaccine*. 2018;36(20):2855-60.

Cunningham W, Geard N, Fielding J, Braat S, Madhi S, Nunes M, Christian L, Lin S, Lee C, Yamaguchi K, Bisgaard H, Chawes B, Chao A, Blanchard-Rohner G, Schlaudecker E, Fisher B, McVernon J, Moss R. Optimal timing of influenza vaccine during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Influenza And Other Respiratory Viruses*. 2019;13(5):438-52.

Dabrera G, Zhao H, Andrews N, Begum F, Green H, Ellis J, Elias K, Donati M, Zambon M, Pebody R. Effectiveness of seasonal influenza vaccination during pregnancy in preventing influenza infection in infants, England, 2013/14. *Euro Surveillance*. 2014;19(45):20959.

Dawood F, Iuliano A, Reed C, Meltzer M, Shay D, Cheng P, Bandaranayake D, Breiman R, Brooks W, Buchy P, Feikin D, Fowler K, Gordon A, Hien N, Horby P, Huang Q, Katz M, Krishnan A, Lal R, Montgomery J, Mølbak K, Pebody R, Presanis A, Razuri H, Steens A, Tinoco Y, Wallinga J, Yu H, Vong S, Bresee J, Widdowson M. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012;12(9):687-95.

DeSilva M, Munoz F, McMillan M, Kawai A, Marshall H, Macartney K, Joshi J, Onoko M, Rose A, Dolk H, Trotta F, Spiegel H, Tomczyk S, Shrestha A, Kochhar S, Kharbanda E, Brighton Collaboration Congenital Anomalies Working Group. Congenital anomalies: Case

definition and guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*. 2016;34(49):6015-26.

DGS, (Direção Geral da Saúde). Programa Nacional para a Vigilância da Gravidez de Baixo Risco. 2015.

DGS, (Direção Geral da Saúde). Vacinação contra a gripe. Época 2019/2020. 2019.

DGS, (Direção Geral da Saúde), Departamento de Doenças Infecciosas, Departamento de Epidemiologia, Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2017/2018 Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; 2018.

Donahue J, Kieke B, King J, DeStefano F, Mascola M, Irving S, Cheetham T, Glanz J, Jackson L, Klein N, Naleway A, Weintraub E, Belongia E. Association of spontaneous abortion with receipt of inactivated influenza vaccine containing H1N1pdm09 in 2010-11 and 2011-12. *Vaccine*. 2017;35(40):5314-22.

Fabiani M, Bella A, Rota M, Clagnan E, Gallo T, D'Amato M, Pezzotti P, Ferrara L, Demicheli V, Martinelli D, Prato R, Rizzo C. A/H1N1 pandemic influenza vaccination: A retrospective evaluation of adverse maternal, fetal and neonatal outcomes in a cohort of pregnant women in Italy. *Vaccine*. 2015;33(19):2240-7.

Fell D, Platt R, Lanes A, Wilson K, Kaufman J, Basso O, Buckeridge D. Fetal death and preterm birth associated with maternal influenza vaccination: systematic review. *International Journal Of Obstetrics And Gynaecology*. 2015;122(1):17-26.

Giles M, Krishnaswamy S, Macartney K, Cheng A. The safety of inactivated influenza vaccines in pregnancy for birth outcomes: a systematic review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019;15(3):687-99.

Jeong S, Jang E, Jo J, Jang S. Effects of maternal influenza vaccination on adverse birth outcomes: A systematic review and Bayesian meta-analysis. *PLOS ONE*. 2019;14(8):1-17.

Jones C, Heath P. Antenatal immunization. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014;10(7):2118-22.

Kallen B, Olausson P. Vaccination against H1N1 influenza with Pandemrix((R)) during pregnancy and delivery outcome: a Swedish register study. *International Journal Of Obstetrics And Gynaecology*. 2012;119(13):1583-90.

Katz J, Englund J, Steinhoff M, Khatry S, Shrestha L, Kuypers J, Mullany L, Chu H, LeClerq S, Kozuki N, Tielsch J. Impact of timing of influenza vaccination in pregnancy on transplacental antibody transfer, influenza incidence, and birth outcomes: a randomized trial in rural Nepal. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;67(3):334-40.

Kharbanda E, Vazquez-Benitez G, Romitti P, Naleway A, Cheetham T, Lipkind H, Klein N, Lee G, Jackson M, Hambidge S, McCarthy N, DeStefano F, Nordin J. First Trimester Influenza Vaccination and Risks for Major Structural Birth Defects in Offspring. *The Journal of Pediatrics*. 2017;187:1-19.

Koul P, Mir H. The biggest barrier to influenza vaccination in pregnant females in India: poor sensitization of the care providers. *Vaccine*. 2018;36(25):3569-70.

Krishnaswamy S, Lambach P, Giles M. Key considerations for successful implementation of maternal immunization programs in low and middle income countries. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019;15(4):1-9.

Laake I, Tunheim G, Robertson A, Hungnes O, Waalen K, Haberg S, Mjaaland S, Trogstad L. Risk of pregnancy complications and adverse birth outcomes after maternal A(H1N1)pdm09 influenza: a Norwegian population-based cohort study. *BMC Infectious Diseases*. 2018;18(525):1-9.

Lafond K, Nair H, Rasooly M, Valente F, Booy R, Rahman M, Kitsutani P, Yu H, Guzman G, Coulibaly D, Armero J, Jima D, Howie S, Ampofo W, Mena R, Chadha M, Sampurno O, Emukule G, Nurmatov Z, Corwin A, Heraud J, Noyola D, Cojocar R, Nymadawa P, Barakat A, Adedeji A, von Horoch M, Olveda R, Nyatanyi T, Venter M, Mmbaga V, Chittaganpitch M, Nguyen T, Theo A, Whaley M, Azziz-Baumgartner E, Bresee J, Campbell H, Widdowson M. Global Role and Burden of Influenza in Pediatric Respiratory Hospitalizations, 1982-2012: A Systematic Analysis. *PLoS Medicine*. 2016;13(3):1-19.

Levinson W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 13 ed: AMGH; 2016.

Li R, Xie R, Yang C, Rainey J, Song Y, Greene C. Identifying ways to increase seasonal influenza vaccine uptake among pregnant women in China: a qualitative investigation of pregnant women and their obstetricians. *Vaccine*. 2018;36(23):3315-22.

Liu D, Xu J, Yu X, Tong F, Walline J, Fu Y, Zhao K. Clinical Characteristics and Prognosis of Influenza B Virus-Related Hospitalizations in Northern China during the 2017-18 Influenza Season: A Multicenter Case Series. *BioMed Research International*. 2019:1-8.

Louik C, Kerr S, Bennekou C, Chambers C, Jones K, Schatz M, Mitchell A. Safety of the 2011-12, 2012-13, and 2013-14 seasonal influenza vaccines in pregnancy: Preterm delivery and specific malformations, a study from the case-control arm of VAMPSS. *Vaccine*. 2016;34(37):4450-9.

Ludvigsson J, Strom P, Lundholm C, Cnattingius S, Ekblom A, Ortqvist A, Feltelius N, Granath F, Stephansson O. Risk for Congenital Malformation With H1N1 Influenza Vaccine: A Cohort Study With Sibling Analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2016;165(12):848-55.

Mackenzie I, MacDonald T, Shaki S, Dryburgh M, Mantay B, McDonnell P, Layton D. Influenza H1N1 (swine flu) vaccination: a safety surveillance feasibility study using self-reporting of serious adverse events and pregnancy outcomes. *British Journal Of Clinical Pharmacology*. 2012;73(5):801-11.

Madhi S, Cutland C, Kuwanda L, Weinberg A, Hugo A, Jones S, Adrian P, Niekerk N, Treurnicht F, Ortiz J, Venter M, Violari A, Neuzil K, Simões E, Klugman K, Nunes M. Influenza Vaccination of Pregnant Women and Protection of Their Infants. *The New England Journal of Medicine*. 2014;371(10):918-31.

Madhi S, Nunes M. Experience and challenges on influenza and pertussis vaccination in pregnant women. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2018;14(9):2183-8.

Maltezou H, Koutroumanis P, Kritikopoulou C, Theodoridou K, Katerelos P, Tsiaousi I, Rodolakis A, Loutradis D. Knowledge about influenza and adherence to the recommendations for influenza vaccination of pregnant women after an educational intervention in Greece. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019;15(5):1-5.

McMillan M, Porritt K, Kralik D, Costi L, Marshall H. Influenza vaccination during pregnancy: a systematic review of fetal death, spontaneous abortion, and congenital malformation safety outcomes. *Vaccine*. 2015;33(18):2108-17.

Mølgaard-Nielsen D, Fischer k, Krause T, Hviid A. Effectiveness of maternal immunization with trivalent inactivated influenza vaccine in pregnant women and their infants. *Journal of Internal Medicine*. 2019;286(4):469-80.

Munoz F, Jackson L, Swamy G, Edwards K, Frey S, Stephens I, Ault K, Winokur P, Petrie C, Wolff M, Patel S, Keitel W. Safety and immunogenicity of seasonal trivalent inactivated influenza vaccines in pregnant women. *Vaccine*. 2018;36(52):8054-61.

Nayak S. Influenza Vaccine Requirements in Pregnant Women. *The Journal Of Obstetrics And Gynecology Of India*. 2016;66(2):76-80.

Newman L, Bhat N, Fleming J, Neuzil K. Global influenza seasonality to inform country-level vaccine programs: An analysis of WHO FluNet influenza surveillance data between 2011 and 2016. *PLOS ONE*. 2018;13(2):1-11.

NIAC, (National Immunization Advisory Committee), Technical Working Group (TWG), Influenza Vaccination TWG. Technical guidelines for seasonal influenza vaccination in China (2019-2020). *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2020;54(1):21-36.

Nunes M, Aqil A, Omer S, Madhi S. The effects of influenza vaccination during pregnancy on birth outcomes: a systematic review and meta-analysis. *American Journal Of Perinatology*. 2016a;33(11):1104-14.

Nunes M, Cutland C, Jones S, Hugo A, Madimabe R, Simões E, Weinberg A, Madhi S. Duration of infant protection against influenza illness conferred by maternal immunization: secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Pediatrics*. 2016b;170(9):840-7.

Nunes M, Madhi S. Influenza vaccination during pregnancy for prevention of influenza confirmed illness in the infants: A systematic review and meta-analysis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2018;14(3):758-66.

Omer S, Dayna C, Aqil A, Tapia M, Nunes M, Kozuki N, Steinhoff M, Madhi S, Wairagkar N. Maternal influenza immunization and prevention of severe clinical pneumonia in young infants: analysis of randomized controlled trials conducted in Nepal, Mali and South Africa. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2018;37(5):436-40.

Oppermann M, Fritzsche J, Weber-Schoendorfer C, Keller-Stanislowski B, Allignol A, Meister R, Schaefer C. A(H1N1)v2009: a controlled observational prospective cohort study on vaccine safety in pregnancy. *Vaccine*. 2012;30(30):4445-52.

Ortiz J, Perut M, Dumolard L, Wijesinghe P, Jorgensen P, Roper A, Danovaro-Holliday M, Heffelfinger J, Tevi-Benissan C, Tebb N, Lambach P, Hombach J. A global review of national influenza immunization policies: analysis of the 2014 WHO/UNICEF joint reporting form on immunization. *Vaccine*. 2016;34(45):5400-5.

Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C. Human Influenza Virus Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016;37(4):487-500.

Polyzos K, Konstantelias A, Pitsa C, Falagas M. Maternal Influenza Vaccination and Risk for Congenital Malformations. *Obstetrics & Gynecology*. 2015;126(5):1075-84.

Prospero E, Galmozzi S, Paris V, Felici G, Barbadoro P, D'Alleva A, Zocco G, Ciavattini A. Factors influencing refusing of flu vaccination among pregnant women in Italy: healthcare workers' role. *Influenza And Other Respiratory Viruses*. 2019;13(2):201-7.

Rasmussen S, Jamieson D. 2009 H1N1 Influenza and Pregnancy - 5 Years Later. *The New England Journal of Medicine*. 2014;371(15):1373-5.

Regan A. The safety of maternal immunization. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(12):3132-6.

Regan A, Tracey L, Blyth C, Mak D, Richmond P, Shellam G, Talbot C, Effler P. A prospective cohort study comparing the reactogenicity of trivalent influenza vaccine in pregnant and non-pregnant women. *BioMed Central - Pregnancy and Childbirth*. 2015;15:61-8.

Rein J, Etra A, Patel J, Stein J, Rivers A, Gershengorn H, Awerbuch E, Kreiswirth B, Koshy S. Death of Woman with Peripartum Influenza B Virus Infection and Necrotizing Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(7):1258-60.

Restivo V, Costantino C, Bono S, Maniglia M, Marchese V, Ventura G, Casuccio A, Tramuto F, Vitale F. Influenza vaccine effectiveness among high-risk groups: A systematic literature review and meta-analysis of case-control and cohort studies. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2018;14(3):724-35.

Ribeiro A, Pellini A, Kitagawa B, Marques D, Madalosso G, Fred J, Albernaz R, Carvalhanas T, Zanetta D. Severe influenza A(H1N1)pdm09 in pregnant women and neonatal outcomes. *PLoS One*. 2018;13(3):1-14.

Rojas-Suarez J, Paternina-Caicedo A, Cuevas L, Angulo S, Cifuentes R, Parra E, Fino E, Daza J, Castillo O, A P, Rey G, García S, Peña I, Levinson A, Bourjeily G. Maternal mortality due to pandemic influenza A H1N1 2009 virus in Colombia *Journal of Perinatal Medicine*. 2014;42(1):19-26.

Sakala I, Honda-Okubo Y, Fung J, Petrovsky N. Influenza immunization during pregnancy: Benefits for mother and infant. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(12):3065-71.

Somerville L, Basile K, Dwyer D, Kok J. The impact of influenza virus infection in pregnancy. *Future Microbiology*. 2018;13(2):263-74.

Thain S, Tan S, Tagore S. Knowledge, perception and maternal immunisation practices of obstetricians in Singapore for the Tdap and influenza vaccines. *Singapore Medical Journal*. 2019;1-14.

Thompson M, Kwong J, Regan A, Katz M, Drews S, Azziz-Baumgartner E, Klein N, Chung H, Effler P, Feldman B, Simmonds K, Wyant B, Dawood F, Jackson M, Fell D, Levy A, Barda N, Svenson L, Fink R, Ball S, Naleway A. Influenza Vaccine Effectiveness in Preventing Influenza-associated Hospitalizations During Pregnancy: A Multi-country Retrospective Test Negative Design Study, 2010–2016. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;68(9):1444-53.

Thompson M, Li D, Shifflett P, Sokolow L, Ferber J, Kurosky S, Bozeman S, Reynolds S, Odouli R, Henninger M, Kauffman T, Avalos L, Ball S, Williams J, Irving S, Shay D, Naleway A, Chu S, Cragan J, McIntyre A, Villanueva J, Fry A, Bresee J, Tokars J, Seward J. Effectiveness of Seasonal Trivalent Influenza Vaccine for Preventing Influenza Virus Illness Among Pregnant Women: A Population-Based Case-Control Study During the 2010–2011 and 2011–2012 Influenza Seasons. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;58(4):449-57.

- Trotta F, Cas R, Alegiani S, Gramegna M, Venegoni M, Zocchetti C, Traversa G. Evaluation of safety of A/H1N1 pandemic vaccination during pregnancy: cohort study. *BMJ*. 2014;348:1-11.
- Vojtek I, Dieussaert I, Doherty T, Franck V, Hanssens L, Miller J, Bekkat-Berkani R, Kandeil W, Prado-Cohrs D, Vyse A. Maternal immunization: where are we now and how to move forward? *Annals of Medicine*. 2018;50(3):193-208.
- WHO, (World Health Organization). Thiomersal - questions and answers. 2011.
- WHO, (World Health Organization). Vaccines against influenza WHO position paper – November 2012. *Weekly epidemiological record*. 2012a;87(47):461-76.
- WHO, (World Health Organization). Safety of Immunization during Pregnancy - A review of the evidence. 2014.
- WHO, (World Health Organization). Influenza (Avian and other zoonotic). 2018a.
- WHO, (World Health Organization). Influenza (Seasonal). 2018b.
- WHO, (World Health Organization). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2020 - 2021 northern hemisphere influenza season. 2020a.
- WHO, (World Health Organization). Thiomersal. 2020b.
- WHO, (World Health Organization). Types of seasonal influenza vaccine. 2020c.
- WHO, (World Health Organization), SAGE Working Group. Background Paper on Influenza Vaccines and Immunization. 2012b.
- Wilcox C, Bottrell K, Paterson P, Schulz W, Vandrevia T, Larson H, Jones C. Influenza and pertussis vaccination in pregnancy: portrayal in online media articles and perceptions of pregnant women and healthcare professionals. *Vaccine*. 2018;36(50):7625-31.
- Wilson R, Paterson P, Jarrett C, Larson H. Understanding factors influencing vaccination acceptance during pregnancy globally: a literature review. *Vaccine*. 2015;33(47):6420-9.
- Wu Y, Qi F, Song D, He Z, Zuo Z, Yang Y, Liu Q, Hu S, Wang X, Zheng X, Yang J, Yuan Q, Zou J, Guo K, Yao Z. Prenatal influenza vaccination rescues impairments of social behavior and lamination in a mouse model of autism. *Journal of Neuroinflammation*. 2018;15(228):1-17.
- Xia Y, Qi F, Zou J, Yang J, Yao Z. Influenza vaccination during early pregnancy contributes to neurogenesis and behavioral function in offspring. *Brain, Behavior And Immunity*. 2014;42:212-21.
- Yuen C, Tarrant M. Determinants of uptake of influenza vaccination among pregnant women – A systematic review. *Vaccine*. 2014;32(36):4602-13.
- Zhang C, Wang X, Liu D, Zhang L, Sun X. A systematic review and meta-analysis of fetal outcomes following the administration of influenza A/H1N1 vaccination during pregnancy. *International Journal Of Obstetrics And Gynaecology*. 2018;141(2):141-50.

MESTRADO

Análises Clínicas

Relatório de Estágio Profissional

Unilabs - Laboratório de Patologia Clínica Dr. Hilário de Lima

Inês Mesquita

M

2020



AGRADECIMENTOS

É de coração cheio que termino mais uma etapa e não poderia deixar de agradecer a todos os que me acompanharam neste percurso.

Quero agradecer a Doutora Marta Lima do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Hilário de Lima – Unilabs e a todos os técnicos superiores de saúde por me terem recebido tão bem e por toda a dedicação e ajuda, principalmente à Doutora Clara Ribeiro da microbiologia, à Doutora Celine Macedo da hematologia, ao Doutor Miguel Gome e à Doutora Isabel da bioquímica e imunologia por me terem orientado ao longo do estágio.

A todos o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	x
1. Introdução	1
2. Laboratório de patologia clínica Dr. Hilário de Lima	2
3. Triagem	3
4. Microbiologia	4
4.1. Colheita e sementeira primaria de produtos biológicos	5
4.2. Técnicas de identificação	12
4.3. Hemoculturas	15
4.4. Espermogramas	16
5. Hematologia	18
5.1. Hemograma	20
5.2. Velocidade de sedimentação	29
5.3. Hemoglobina glicosilada	31
5.4. Hemostase	33
5.5. Grupos sanguíneos	37
5.6. Teste imunocromatográfico	39
6. Bioquímica	40
6.1. Determinações bioquímicas	41
6.2. Proteínograma	45
6.3. Gasimetria	47
7. Imunologia	49
7.1. Determinações imunológicas	50
7.2. Determinações viricas e hormonais	53
7.3. Verificação de resultados	55
7.4. Testes imunocromatográficos	56
8. Conclusão	57
9. Referências bibliográficas	58

LISTA DE ABREVIATURAS

6-AM – 6-Acetil morfina

Ac – Anticorpo

Ag – Antigénio

AGH – Antiglobulina humana

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

BF – Líquidos biológicos

Ca²⁺ - Cálcio ionizado

CC – Caldo de carne

CFRT – Gene regulador de condutância transmembranar da fibrose cística

CL⁻ - Cloreto

CMV – Citomegalovírus

CO₂ – Dióxido de carbono

CromoG – Meio seletivo de MRSA

CSF – Fluído cérebroespinal

EA – Éster de acridina

ELFA – Teste imunoenzimático por fluorescência

EP – Embolia pulmonar

FC – Fibrose cística

FFC – Citometria de fluxo por fluorescência

FSC – Dispersão frontal

GARD – Gelose Gardnerella

GCHOC – Agar de chocolate

GS – Gelose de sangue

Hb – Hemoglobina

HbA_{1c} – Hemoglobina glicosilada

HCT – Hematócrito

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho

IG – Granulócitos imaturos

INR – Rácio Normalizado Internacional

IPF – Fração imatura de plaquetas

IRF – Fração imatura de reticulócitos

ISE – Eléctrodo ião-seletivo

ISI – Índice Internacional de Sensibilidade

K⁺ - Potássio

LDH – Lactato desidrogenase

MC – Gelose MacConkey

MCH – Hemoglobina corpuscular média

MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV – Volume corpuscular médio

MN – Mononucleares

MPV – Volume plaquetário médio

MRSA – *S. aureus* resistentes à metilina

Na⁺ - Sódio

Neiss – Micro Neisseria Medium

NRBC – Eritroblastos

P-LCR – Percentual de plaquetas grandes

pCO₂ – Pressão de dióxido de carbono

pO₂ – Pressão de oxigénio

PCR – Proteína C Reativa

PCT – Plaquetocrito

PDW – Amplitude de variação do tamanho das plaquetas

pLDH – Enzima lactose desidrogenase do parasita

PLT – Plaquetas

PLT-F – Plaquetas por fluorescência

PMN – Polimorfonucleares

RBC – Eritrócitos

RDW – Coeficiente de variação do volume de eritrócitos

RET – Reticulócitos

RET-Hb – Hemoglobina nos eritrócitos

Rh – Sistema Rhesus

RhD – Antígeno D

RP – Rácio de protrombina

rpm – Rotações por minuto

SAB – Sabouraud

SAFLAS - Algoritmo adaptável de alarmes Sysmex baseado no reconhecimento da forma da área da população celular

SFL – Fluorescência lateral

SLS – Lauril sulfato de sódio

SS – Agar Salmonella Shigella

SSC – Dispersão lateral

sTfR – Recetor de transferrina solúvel

STRB – *Streptococcus* do grupo B

TC-BF – Contagem total nos líquidos biológicos

TF – Fator tecidular

TP – Tempo de protrombina

TT - Tempo de trombina

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TVP – Trombose venosa profunda

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

VS – Velocidade de sedimentação

WBC – Leucócitos

γ-GT – Gama-glutamyltransferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Setor de microbiologia	4
Figura 2: Equipamento – Plataforma integrada iRICELL	10
Figura 3: Demonstração do procedimento da coloração de Gram	12
Figura 4: Exemplos de testes imunocromatográficos usados no setor de microbiologia	14
Figura 5: Equipamento para a prova do suor, 3100 Sweat-Chek	14
Figura 6: Equipamento de hemoculturas, Bact/ALERT 3D 60	15
Figura 7: Setor de hematologia	19
Figura 8: Equipamento de hemogramas, Sysmex XN-1000	20
Figura 9: Metodologia de citometria de fluxo por fluorescência	21
Figura 10: Partícula iluminada por um raio laser semiconductor	21
Figura 11: Princípio da impedância com focagem hidrodinâmica	22
Figura 12: Hemoglobina pelo método Lauril sulfato de sódio	22
Figura 13: Representação do canal WNR	25
Figura 14: Representação do canal WDF	26
Figura 15: Representação do canal PLT-F	27
Figura 16: Representação do canal RET	27
Figura 17: Representação do canal diferencial de 2-partes em líquidos biológicos	28
Figura 18: Técnica do esfregaço sanguíneo	29
Figura 19: Equipamento da VS, VES-MATIC CUBE 80	30
Figura 20: Diagrama de ligação da HbA1c e respetivo gráfico das concentrações de hemoglobina glicosilada e não glicosilada	31
Figura 21: Equipamento de HbA1c, Hb9210 Premier da Menarini Diagnostics	32

Figura 22: Esquema representativo da cascata de coagulação	34
Figura 23: Fibrinólise	34
Figura 24: Equipamento de hemostase, Sysmex CS-2500 System	35
Figura 25: Exemplo de um Card-ID ‘DiaCLON ABO/D’ da BIO-RAD	38
Figura 26: Exemplo de um Card-ID ‘LISS/Coombs + Enzyme Test’ da BIO-RAD	38
Figura 27: Resultados possíveis através do teste OptiMAL-IT da BIO-RAD	39
Figura 28: Uma parte do setor de bioquímica e imunologia	40
Figura 29: Equipamento de determinações bioquímicas, ADVIA 1800 Chemistry System da Siemens	41
Figura 30: Representação esquemática do método colorimétrico	42
Figura 31: Representação esquemática do método imunoturbidimétrico	42
Figura 32: Gráfico normal das bandas obtidas no proteínograma	46
Figura 33: Equipamento dos proteínograma, Capillarys 2 Flex Piercing	46
Figura 34: Equipamento de gasimetria arterial, RAPIDLab® 348 EX Blood Gas System	47
Figura 35: Equipamento de imunologia, ADVIA Centaur XP Immunoassay System	50
Figura 36: Exemplo de um protocolo para deteção de insulina usando um imunoensaio de quimioluminescência direta e o marcador EA	51
Figura 37: Equipamento de imunologia, IMMULITE 2000 Immunoassay System	54
Figura 38: Equipamento de imunologia, VIDAS®	55
Figura 39: Exemplar de um teste usado para deteção de drogas na urina, Drug-Screen BZD 100 Test	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de meios de cultura necessários de acordo com o tipo de amostra _ 8

Tabela 2: Avaliação quantitativa da amostra de urina em meio CLED e meio GS _____ 9

1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular tem como principal objetivo proporcionar aos alunos os instrumentos de preparação necessários para a introdução e inserção no mercado de trabalho, mediante ambiente de aprendizagem e acompanhamento adequado. Pressupõe-se que exista um processo de aprendizagem e profissionalização, onde através do estágio, os alunos se preparam para assumir um papel importante na sociedade, como profissionais qualificados.

O meu estágio curricular decorreu no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Hilário de Lima - Unilabs, em Braga, sob a orientação da Dr^a Marta Lima e da Dr^a Celine Macedo. Este teve uma duração de 402 horas, distribuídas de 6 de janeiro de 2020 a 13 de março de 2020, com um horário de 8 horas por dia. Não concluindo as 450 horas de estágio programadas devido a sua suspensão por causa do coronavírus.

As análises clínicas são um dos mais importantes meios de diagnóstico complementares, uma vez que, permitem através da recolha de materiais biológicos - como urina; sangue; fezes ou outros tecidos - diagnosticar anomalias, patologias ou doenças de maior ou menor gravidade. Contribuindo, ainda, para a sua prevenção e deteção precoce. Tudo isto, bem como a exigência cada vez maior para resultados mais rápidos, com qualidade e segurança, fazem dos laboratórios de patologias clínicas um local de extrema importância e necessidade nos dias de hoje. De sublinhar ainda que, têm em mãos a responsabilidade de avaliar corretamente cada amostra, uma vez que, um resultado incorreto pode levar a sérias consequências.

No presente relatório encontram-se descritas as atividades e ações que desenvolvi e presenciei ao longo do estágio curricular no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Hilário de Lima.

2. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA DR. HILÁRIO DE LIMA

O Laboratório de Patologia Clínica Dr. Hilário de Lima localiza-se na Avenida da Liberdade 610, 4710-249, no distrito de Braga. A nível de horário, durante a semana (de segunda-feira a sexta-feira) é das 8 às 19 horas, e ao fim de semana, ao sábado funciona das 8 às 12 horas e ao domingo está encerrado.

O meu horário de estágio foi de 8h por dia (a hora de entrada e saída dependeu do setor onde estava), de segunda-feira a sexta-feira. As horas de estágio foram divididas de forma a percorrer todos os setores e a estar em contacto com as diversas áreas, técnicas e equipamentos existentes no laboratório.

O laboratório encontra-se dividido em diversos setores, dos quais: triagem, microbiologia, química, imunologia e hematologia. Para além desses, apesar de não terem feito parte do estágio, ainda existe o setor administrativo, das colheitas e aprovisionamento.

3. TRIAGEM

A secção da triagem representa a fase pré-analítica num laboratório e é constituída por três técnicas superiores de saúde. Para além da receção de amostras, a secção tem a responsabilidade de:

- Atribuir uma matrícula (um número) a cada amostra e respetivo código de barras;
- Controlar a qualidade da colheita efetuada;
- Separar as amostras de acordo com o setor a que são destinadas;
- Centrifugar as amostras que necessitam (como por exemplo: os tubos de citrato para o estudo da hemostase, os soros para o setor da bioquímica e imunologia e as urinas para o setor da bioquímica);
- Separar as amostras que são analisadas no laboratório das que são enviadas para o laboratório central, localizado no Porto, para aí serem analisadas.

No final do dia, há sempre a impressão e verificação da lista de faltas, por forma a controlar todas as amostras que entraram no laboratório e que não foram processadas.

4. MICROBIOLOGIA

A microbiologia é uma ciência em constante evolução que estuda os microrganismos, podendo estes ser divididos em quatro grupos - bactérias, fungos e parasitas - cada um com o seu próprio grau de complexidade (Murray P, 2008). Deste modo, a microbiologia abrange áreas como a parasitologia, micologia e bacteriologia.

O laboratório de microbiologia (Figura 1), coordenado pela Dr^a Clara Ribeiro, desempenha um papel fundamental no diagnóstico, tratamento e controlo de doenças infecciosas. No entanto, a capacidade do laboratório em desempenhar estas funções depende muito da qualidade da colheita, do transporte até ao laboratório e das técnicas usadas na amostra em causa (Murray P, 2008). A secção é constituída por: três técnicas superiores de saúde e uma técnica sem curso.

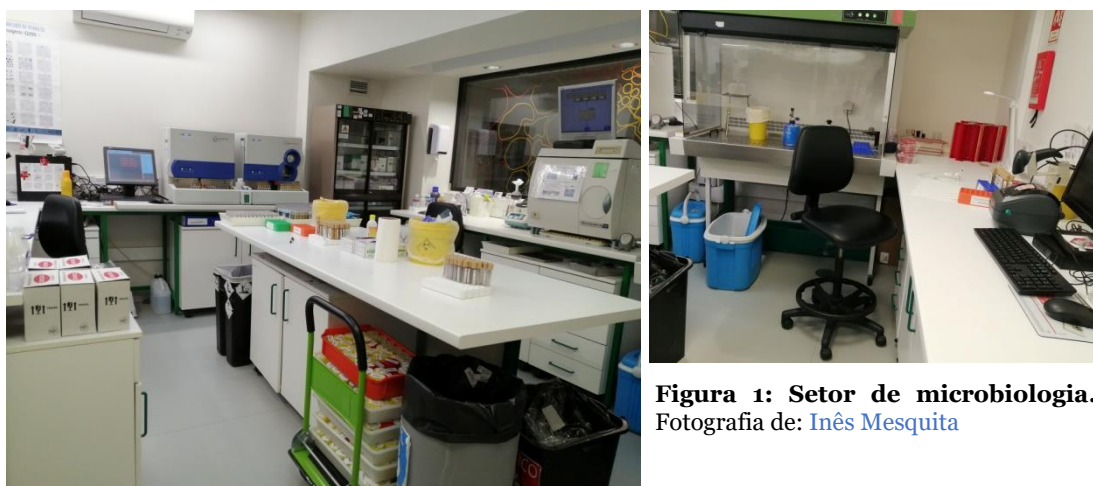


Figura 1: Setor de microbiologia.
Fotografia de: Inês Mesquita

O laboratório recebe diariamente uma grande diversidade de produtos biológicos entre os quais: urinas, secreções respiratórias, exsudados vaginais, uretrais, nasais, auriculares, vulvo-anais, espermatozoides, fezes e outros líquidos biológicos (cefalorraquidiano, peritoneal, pleural, sinovial) – para pesquisa de bactérias, fungos e/ou parasitas, de forma a detetar os agentes etiológicos no caso de haver infeção.

A rotina diária neste setor inicia-se com a verificação dos equipamentos e a passagem de controlos de qualidade pelos mesmos para, aquando da chegada das amostras ao setor estar tudo operacional. As amostras que chegam ao setor da microbiologia, passam primeiramente pelo setor administrativo e/ou pela triagem. Uma vez chegadas as amostras ao setor, confirma-se a matrícula e triam-se as amostras que não foram triadas anteriormente na triagem. Posteriormente, faz-se o seu processamento de acordo com o produto biológico em causa. No final do dia, há sempre a verificação das listas de trabalho e se existem produtos em falta.

Para além disso, a Dr^a Clara, tem a responsabilidade de observar microscopicamente as lâminas dos exames a fresco e dos corados, avaliar diariamente as culturas semeadas nos dias anteriores (validando as negativas e enviando para o laboratório central, no Porto, as duvidosas ou positivas para respetiva identificação) e de realizar os espermogramas.

Nesta secção, foi-me permitido observar a rotina diária laboratorial e a execução da maioria das tarefas, incluindo: etiquetagem e separação das amostras de acordo com os requisitos (colocando as urinas do tipo II que pediam análise bioquímica e/ou sedimento nos respetivos equipamentos); colorações como a de Gram e Ziehl-Neelsen tradicional; observação de testes rápidos; observação de culturas dos diversos produtos biológicos e sua validação; sementeira de urinas e diversos produtos biológicos; lâminas de exames a fresco; espermogramas; e o processamento das urinas de 24 horas.

4.1. Colheita e sementeira primária de produtos biológicos

A qualidade dos resultados microbiológicos depende muito da qualidade das amostras recebidas, pelo que amostras colhidas e transportadas corretamente até ao laboratório são essenciais para a qualidade dos resultados.

Existem critérios de rejeição de amostras, tais como: amostra não identificada; discrepância entre a identificação da requisição e da amostra; amostra em recipiente visivelmente danificado ou contaminado; amostra enviada em recipiente visivelmente inadequado; atraso excessivo entre a colheita e a receção no laboratório; volume insuficiente de amostra, entre outros.

Quando colocados em meios de cultura, os microrganismos precisam que o meio contenha as condições ideais para o seu crescimento. Os meios de cultura podem apresentar-se em estado líquido (caldo nutritivo) - os nutrientes encontram-se dissolvidos e o crescimento microbiano apresenta-se através da turvação do meio e/ou produção de gás - ou em fase sólida (agar). Além disso, podem ser divididos em quatro categoriais ([Murray P, 2008](#)):

- **Enriquecidos:**
Contêm nutrientes específicos para o crescimento de um determinado microrganismo patogénico;
- **Não seletivos:**
Contêm nutrientes para o crescimento da maioria dos microrganismos, sem favorecer o crescimento de um microrganismo específico;
- **Seletivos:**
Contêm agentes inibitórios, como antibióticos, que permitem apenas o crescimento dos microrganismos resistentes;

- **Diferenciais:**

Apresentam fatores que permitem distinguir os microrganismos pelas suas características metabólicas.

Os meios de culturas mais usados, diariamente, neste setor são:

- **Gelose de sangue (GS):**

Meio altamente nutritivo com 5% de sangue de carneiro, de uso geral, recomendado para o isolamento da maioria dos microrganismos, exigentes ou não. Detecção de hemólise ([Holanda C, 2017](#));

- **Meio de CLED:**

Meio diferencial recomendado para o isolamento de microrganismos na urina. Permite o crescimento de patogénicos urinários e inibe o ‘swarming’ de *Proteus* spp. (devido à deficiência em eletrólitos). Diferencia microrganismos fermentadores da lactose (originam colónias amarelas por acidificação do meio) de microrganismos não-fermentadores da lactose (originam colónias azuis ou incolores) ([bioMérieux® - CLED](#)).

- **Agar de Chocolate (GCHOC):**

Meio enriquecido recomendado para o isolamento e crescimento de bactérias fastidiosas e exigentes, como *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. e *Helicobacter* spp. Culturas podem ser examinadas após 24-48 horas de incubação, no entanto, alguns casos necessitam de incubar até 72 horas ([bioMérieux® - GCHOC](#)).

- **Micro Neisseria Medium (Neiss):**

Meio seletivo recomendado para o isolamento e cultivo de *Neisseria* spp. Inibe a maioria dos outros Gram-negativos (como diplococos e bacilos), Gram-positivos e leveduras. Culturas podem ser examinadas após 18-48 horas de incubação, no entanto, alguns casos necessitam de incubar até 72 horas ([bioMérieux® - Neiss](#)).

- **Gelose Gardnerella (GARD):**

Meio seletivo e diferencial recomendado para o isolamento de *Gardnerella vaginalis*, sendo facilmente detetadas pela produção de beta-hemólise à volta das colónias. Inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e leveduras ([bioMérieux® - GARD](#)).

- **Gelose MacConkey (MC):**

Meio diferencial e seletivo recomendado para o isolamento de bacilos entéricos Gram-negativos. Inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e fungos. Diferencia microrganismos fermentadoras de lactose (colónias rosa) de microrganismos não-fermentadores de lactose ([Holanda C, 2017](#)).

- **Sabouraud (SAB):**

Meio seletivo e enriquecido recomendado para o isolamento de fungos filamentosos. Inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ([Murray P, 2008](#)).

- **Streptococcus do grupo B (STRB):**

Meio diferencial recomendado para o isolamento de *Streptococcus agalactiae* (beta-hemolítico).

- **Caldo de TODD:**

Caldo enriquecido e seletivo recomendado para a deteção de *Streptococcus* spp. (estreptococos do grupo B), principalmente em mulheres grávidas. Inibe a maioria dos microrganismos Gram-negativos. Ainda pode ser usado no rastreio de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) através do enriquecimento para *S. aureus* ([bioMérieux® - TODD](#)).

- **Caldo de carne (CC):**

Caldo enriquecido recomendado para o crescimento de microrganismos anaeróbios, como *Clostridium* spp. Crescimento visualizado através da turvação e produção de gás ([Murray P, 2008](#)).

- **Caldo GN:**

Caldo seletivo recomendado para bactérias Gram-negativas de amostras de fezes, como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Inibe bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de crescimento rápido ou comensais do trato gastrointestinal.

- **Agar Salmonella Shigella (SS):**

Meio seletivo e diferencial recomendado para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Inibe bactérias Gram-positivas, a maioria das bactérias coliformes e o 'swarming' de *Proteus* spp. Diferencia de bactérias fermentadoras de lactose

(apresentam colónias vermelhas) e deteta bactérias produtoras de ácido sulfídrico (H₂S) (apresentam colónias com centro negro) (bioMérieux® - SS).

Assim, e como diferentes tipos de amostras biológicas dão entrada no setor diariamente, dependendo da amostra vão ser necessários diferentes meios, como podemos ver na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de meios de cultura necessários de acordo com o tipo de amostra.

Amostra	Meios de cultura
Urina	GS e CLED
Ouvido	GS, CLED e GCHOC
Nasal	CromoG* e GCHOC
Vaginal ou Cervical vaginal	Neiss, GS, GCHOC, GARD e SAB
Uretral	Neiss, SAB, GCHOC e GS
Vulvo-anal	GS, STRB e TODD
Expetoração	GS, GCHOC e MC
Esperma	VCAT, GS, GCHOC e SAB
Outros produtos biológicos (como tecidos)	MC, GS, GCHOC e CC

*CromoG: meio seletivo de MRSA.

1. Urinas

Normalmente o aparelho urinário superior é isento de microrganismos, pelo que, a urina na bexiga é estéril. Contudo, quando passa pela porção distal da uretra e região envolvente adquire microrganismos da flora microbiana comensal. Esta flora comensal é constituída principalmente por bactérias Gram-positivas – como *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* α e β-hemolíticos, *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. – e algumas *Enterobacteriaceae* (bactérias Gram-negativas) (Flores-Mireles A, 2015; Levinson W, 2016).

A infeção do trato urinário pode ser causada por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e/ou fungos. O microrganismo mais comum neste tipo de infeções é a *Escherichia coli* uropatogénica. Porém, existem outros agentes causadores de infeção do trato urinário, incluindo: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* do grupo B, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp. (Flores-Mireles A, 2015).

Para o diagnóstico de infeção do aparelho urinário são recebidas neste setor amostras de urina de micção “jato médio” (primeira urina da manhã rejeitando o primeiro jato, ou se impossível, após pelo menos duas horas sem urinar), punção de cateter urinário ou saco coletor em crianças. O diagnóstico é realizado com base num exame direto (através de equipamentos) e/ou num exame cultural (sementeiras), dependendo dos requisitos que a amostra pede.

1.1. Sementeira

As amostras de urina são homogeneizadas e semeadas em meio CLED e meio GS, recorrendo-se a uma ansa de 1 microlitro (μL) que é mergulhada na amostra. A forma de semear segue um padrão, isto é, faz-se uma estria central no meio com várias estrias perpendiculares à estria central. Posteriormente, as placas são incubadas numa estufa com o ambiente adequado para o crescimento microbiano (atmosfera de aerobiose a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$), durante pelo menos 18 horas. Após a incubação (normalmente no dia seguinte), visualizam-se todas as placas, fazendo-se uma leitura do número de colónias, em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/ml) e, verifica-se se estão concordantes com os do equipamento. Quando positivas (superior ou igual a 10^5 – sinónimo de infeção) ou duvidosas, estas são enviadas para o laboratório do Porto para identificação do agente patológico. Quando negativas ou com colónias 10^3 ou 10^4 , a Dr^a Clara dá baixa do resultado e valida-o (ver Tabela 2), tendo sempre em conta uma serie de parâmetros (como por exemplo: ficha e histórico do doente; se os resultados da sementeira estão de acordo com os do equipamento; entre outros). É importante ter-se em atenção que quando o utente está sob antibioterapia os microrganismos podem crescer apenas em meio GS, não apresentando crescimento em meio CLED, uma vez que o meio GS é mais nutritivo. Outros patogénicos como *Aerococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. crescem em meio GS e não em meio CLED.

Tabela 2: Avaliação quantitativa da amostra de urina em meio CLED e meio GS.

Contagem	Conclusão
$<10^3$ UFC/ml	Ausência de infeção urinária; Resultado positivo no equipamento: reincuba-se
10^3 ou 10^4 UFC/ml	Possibilidade de má técnica de colheita ou não higiene do utente; Fica ao critério do médico dar ou não significância ao valor de acordo com o histórico do utente; Em caso de dúvida envia-se para o Porto
$\geq 10^5$ UFC/ml	Sugestivo de infeção urinária

Adaptado de: (DGS, 2004)

1.2. Equipamento – Plataforma integrada Iricell

A plataforma integrada iRICELL baseia-se em dois equipamentos interligados, um analisador de tiras reativas – Velocity – que realiza a parte bioquímica e um analisador de sedimento urinário - iQ®200 – que realiza a determinação dos elementos existentes na urina em função dos filtros estabelecidos pelo utilizador, como se pode ver na Figura 2.

O Velocity dá-nos informação de diversos parâmetros (como densidade, pH, cor e aspeto da urina, apreciação qualitativa de leucócitos, nitritos, proteínas, glicose, urobilinogénio, bilirrubina, eritrócitos, sangue e corpos cetónicos) e classifica-os de forma semi-quantitativa. Enquanto que, o iQ®200 faz uma análise do sedimento urinário, procurando eritrócitos, leucócitos, bactérias, leveduras, células epiteliais, cilindros e cristais (BECKMAN COULTER - iRICELL).



Figura 2: Equipamento - Plataforma integrada iRICELL.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

Todos os dias, antes da chegada das amostras de urina, é realizada a verificação do equipamento e a passagem de controlos apropriados a cada aparelho de forma a verificar se os resultados estão dentro dos limites protocolados e se o equipamento está pronto para receber as urinas da rotina. No iQ®200 os controlos consistem em sete tubos: um com Cleanser, dois com diluente, um com Control Focus, outro com Control Positivo e outro com Control Negativo, respetivamente. No Velocity passamos três níveis de controlos, o Control CA, o Control CB e o Control CC. Para além disso, também é feita uma calibração do equipamento. À medida que vão chegando as amostras ao setor, as racks vão sendo carregadas e colocadas no tabuleiro de amostras do analisador Velocity. As amostras são então processadas e transferidas automaticamente (através da ponte de ligação) para o analisador de sedimentos iQ®200. No fim do dia é realizada uma limpeza de manutenção ao equipamento.

2. Outros produtos

Como já referido, dependendo do produto biológico em causa são necessários diferentes meios, isto porque os microrganismos a valorizar dependem do produto que estiver em causa. Ao longo do estágio presenciei isso mesmo e pude apreender conhecimentos que até então não tinha qualquer noção, pelo que apresentarei grande parte de seguida, relativamente aos produtos mais frequentes.

2.1. Expetoração

A colheita de expetoração é solicitada aquando de infeção do trato respiratório inferior, sendo esta causada principalmente por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou *H. parainfluenzae*, *Mycobacterium* spp., *Moxarella catarrhalis* e *Klebsiella pneumoniae*. A amostra de expetoração deve estar livre de saliva (poucas ou nenhuma células epiteliais na amostra). A sementeira primária é realizada em meio GS, meio GCHOC e meio MC. Para além da sementeira, ainda se preparam quatro lâminas para visualização microscópica (duas para coloração de Gram e duas para coloração de Ziehl-Neelsen). Pude visualizar ao microscópio lâminas de expetoração positivas para *Streptococcus pneumoniae*, confirmação essa dada pela presença de diplococos.

2.2. Exsudado vaginal ou cervico vaginal

Uma flora vaginal comensal protege o corpo contra infeções urogenital, sendo os lactobacilos as bactérias predominantes. Estes aparecem na puberdade, estando presentes em grande número ao longo da vida da mulher, diminuindo com a velhice ou em caso de infeção.

As infeções genitais são causadas frequentemente por microrganismos como *Trichomonas vaginalis* (parasita), *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* (fungo), *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus* do Grupo-B de Lancefield (*Streptococcus agalactiae*). A sementeira primária é realizada em meio GS, meio GCHOC e meio SS e, em meios seletivos para *Neisseria* e *Gardnerella*. No caso de suspeita de *Candida* spp. semeia-se a amostra em meio seletivo e diferencial para *C. albicans* que, quando positiva, apresenta colónias verdes/azuladas.

2.3. Vulvo-anal

O exame de amostras vulvo-anais é frequentemente solicitado em grávidas para despiste de *Streptococcus agalactiae*, uma vez que, esta bactéria é prejudicial para o feto durante o parto. A sementeira primária é realizada em meio GS, meio STRB e caldo de TODD (caldo

enriquecido para beneficiar o crescimento de beta-hemolíticos). Após incubação, faz-se a passagem do TODD para meio de STRB por forma a verificar a presença de *Streptococcus agalactiae* (colónias vermelho-escuras) após enriquecimento.

2.4. Fezes

O exame das fezes é solicitado principalmente para despiste de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolítica*. A sementeira primária é realizada em meios seletivos e diferenciais – meio Campy, meio MC e meio SS e caldo GN. Após incubação do caldo GN, faz-se uma sementeira deste em meio SS e em meio MC por forma a despistar mais uma vez a presença de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Este caldo tem como função proporcionar às estirpes de *Salmonella* e *Shigella* um crescimento seletivo das mesmas, fazendo com que nesta última sementeira tenhamos a certeza da presença/ausência das estirpes em questão.

4.2. Técnicas de identificação

Para o despiste de microrganismos, como positivos ou negativos, em determinados produtos biológicos, são necessárias algumas técnicas a seguir descritas:

1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica rápida, que permite a classificação e diferenciação entre as duas classes de bactérias mais importantes, Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias são fixadas numa lâmina e coradas sucessivamente por diferentes reagentes. Primeiramente aplica-se o cristal violeta (corante primário), que é fixado aquando aplicação do lugol (solução à base de iodo). De seguida, aplica-se o reagente etanol-acetona que, tem a capacidade de descorar as bactérias que não fixam o corante primário. Posteriormente, é aplicada a safranina, que cora as células descoradas (Figura 3).

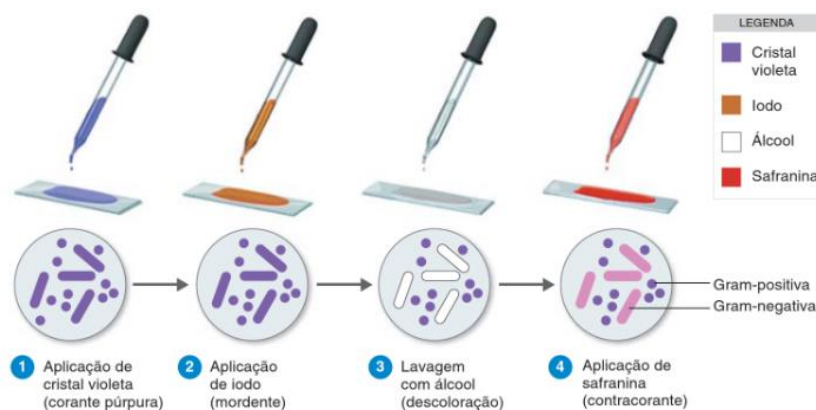


Figura 3: Demonstração do procedimento da coloração de Gram.

A reação de coloração é dependente da parede celular do microrganismo. As bactérias Gram-positivas, que adquirem cor purpura, contêm uma camada grossa de peptidoglicanos que retém o corante primário. As bactérias Gram-negativas, que adquirem cor vermelha, contêm uma parede celular constituída principalmente por lipopolissacarídeos que não retém o corante primário, corando com a safranina. Este tipo de coloração deve ser realizado no máximo até ao dia seguinte após fixação da amostra na lâmina, devido ao envelhecimento da parede celular, que leva ao comprometimento dos resultados (Levinson W, 2016; Murray P, 2008).

2. Coloração de Ziehl-Neelsen

A coloração de Ziehl-Neelsen permite identificar os microrganismos classificados como ácido-álcool resistentes, como é o caso do *Mycobacterium* e da *Nocardia* spp. A técnica baseia-se no facto de a fucsina fenicada, que é aquecida (para tornar a membrana constituída por lípidos permeável), corar todas as células bacterianas presentes no esfregaço de vermelho. Posteriormente, aplica-se o ácido diluído em álcool, que descora tudo menos as bactérias ácido-álcool resistentes, que permanecem coradas de vermelho pela fucsina. Por fim, o azul-de-metileno é usado como contraste (cora de azul as bactérias que não são ácido-álcool resistentes). Esta coloração é feita quase diariamente no setor, principalmente em produtos biológicos como expetorações, líquido pleural e/ou lavado brônquico (Holanda C, 2017).

3. Testes Imunocromatográficos

3.1. BioNexia® *H. pylori* Ag

O *Helicobacter pylori* é um microrganismo que coloniza o estômago humano e leva a gastrites crónicas. O teste bioNexia® *H. pylori* Ag permite a deteção do antígeno *H. pylori* em amostras de fezes humanas.

3.2. BioNexia® Rota-Adeno

O grupo A de Rotavírus e os serotipos 40 e 41 de Adenovírus são causas comuns de gastroenterite viral. O teste bioNexia® Rota-Adeno permite a deteção e diferenciação de Rotavírus e Adenovírus em amostras de fezes humanas, em caso de gastroenterite.

3.3. Cartão BinaxNOW™ *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card

O cartão BinaxNOW™ *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card permite a deteção qualitativa do antígeno da *S. pneumoniae* na urina em caso de pneumonia e/ou no fluido cérebroespinal (CSF) em caso de meningite.

3.4. Cartão BinaxNOW™ *Legionella* Urinary Antigen Card

O cartão BinaxNOW™ *Legionella* Urinary Antigen Card permite a deteção qualitativa do antígeno do sorotipo 1 da *Legionella pneumophila* em amostras de urina.

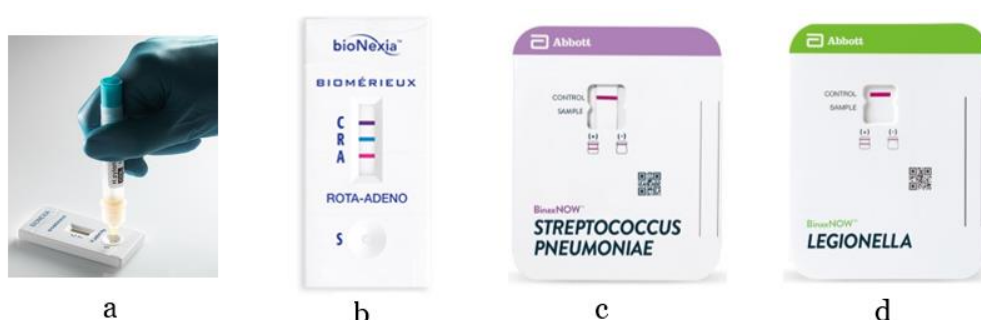


Figura 4: Exemplos de testes imunocromatográficos usados no setor de microbiologia.
a) Teste para *Helicobacter pylori*, b) Teste para Rota-Adeno, c) Teste para *Streptococcus pneumoniae* e d) Teste para *Legionella*.

4. Prova do suor

A fibrose cística (FC), uma doença autossómica recessiva, resulta de mutações no gene regulador de condutância transmembranar da FC (CFTR), que codifica uma proteína do canal iónico, afetando principalmente órgãos como os pulmões e o aparelho digestivo (Farrell P, 2017).

A prova de suor permite diagnosticar a FC, através da medição da concentração do ião cloreto no suor, sendo mais elevada do que nas pessoas saudáveis. Para a realização desta prova recorre-se ao analisador 3100 Sweat-Chek (Figura 5) que, avalia os eletrólitos presentes no suor através de uma amostra de suor.



Figura 5: Equipamento para a prova do suor, 3100 Sweat-Chek.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

4.3. Hemoculturas

As hemoculturas são requeridas, principalmente, quando se suspeita de sepsis. Pelo que, os microrganismos mais comuns são *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

Durante a colheita, o local da punção venosa deve ser limpo com álcool e com uma solução à base de iodo para impedir a contaminação por microrganismos existentes na pele. Quanto ao número de amostras, recomenda-se que sejam entre duas a quatro, de forma a assegurar o isolamento do microrganismo em pelo menos 95% dos testes. Cada amostra é colocada em dois frascos, estando um em condições anaeróbias e outro em condições aeróbias (Holanda C, 2017).

As hemoculturas são incubadas num equipamento, o BacT/ALERT 3D 60 (Figura 6), que as monitoriza em tempo real, através de um detetor colorimétrico, a concentração de dióxido de carbono (CO₂) existente nos frascos. Cada frasco contém na base uma camada que muda de cor (ficando mais intensa) à medida que a concentração de CO₂ aumenta, em caso de existirem microrganismos presentes. As hemoculturas devem ser mantidas em incubação pelo menos durante 5 dias, contudo recorrendo a este equipamento, a grande maioria dos resultados positivos são detetados nas primeiras 48 horas.

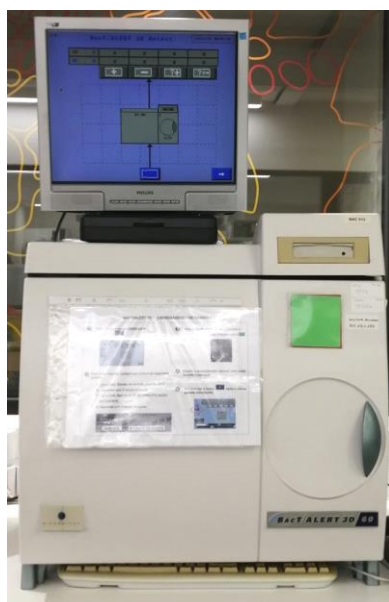


Figura 6: Equipamento de hemoculturas, BacT/ALERT 3D 60.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

4.4. Espermogramas

O espermograma tem por base analisar a quantidade e qualidade dos espermatozoides, sendo solicitado para avaliar a capacidade reprodutiva do homem ou se uma cirurgia de vasectomia foi bem-sucedida.

Ao longo do estágio tive a oportunidade de observar a realização de diversos espermogramas. A amostra de sémen – normalmente uma massa coagulada semissólida - deve ser devidamente colhida para um frasco estéril e mantida a 37°C. Este exame deve ser feito no máximo até 1 hora após a ejaculação, para evitar que a desidratação ou mudanças na temperatura afetem a qualidade da amostra (WHO, 2010).

A análise ocorre em duas etapas, a primeira macroscópica e a segunda microscópica. Na análise macroscópica, avaliam-se critérios como (WHO, 2010):

- **Viscosidade:**

Determinada através da aspiração da amostra recorrendo a uma pipeta descartável e posteriormente deixar cair a amostra lentamente. Esta é considerada normal quando caem pequenas gotas discretas (a gota forma fio com mais de 2 centímetros (cm) de comprimento);

- **Aparência:**

O aspeto de uma amostra de sémen normal após liquefação deve ser homogénea, esbranquiçada e opalescente. Quanto menos opalescente menor é a concentração de espermatozoides na amostra;

- **Cheiro:**

O cheiro característico é denominado de *Sui generis*;

- **pH:**

Deve ser medido após a liquefação recorrendo a tiras indicadoras de pH, mas sem ultrapassar 1 hora após colheita, uma vez que a perda de CO₂ pela amostra pode influenciar o resultado. O valor de referência de pH no sémen é de 7.2 como limite mais baixo;

- **Volume:**

A medição do volume é realizada recorrendo a uma pipeta descartável. Este valor permite o cálculo posterior do número total de espermatozoides e células não espermáticas na amostra. Um volume normal deve ser superior ou igual a 1.5 ml;

- **Tempo de liquefação:**

Após a colheita da amostra, ao fim de alguns minutos o sémen começa a liquefazer (tornar-se mais fino). O tempo de liquefação é considerado completo quando a

amostra se torna homogénea e aguada, sendo considerado um tempo de liquefação normal entre 15 e 60 minutos, não mais que isso.

Na análise microscópica, com o auxílio de um microscópio e de uma câmara de Neubauer, avalia-se ([WHO, 2010](#)):

- **Concentração de espermatozoides:**

A contagem de espermatozoides é realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em que, a concentração de espermatozoides é calculada em função da diluição e do número de quadrantes contados;

- **Motilidade:**

Deve ser avaliada o mais rapidamente possível após a liquefação da amostra, uma vez que, pode ser influenciada por diversos fatores como desidratação ou alteração do pH. Este exame é realizado numa lâmina a fresco e avalia três aspetos: motilidade progressiva (movimento ativo dos espermatozoides); motilidade não progressiva (movimento do espermatozoide sem descolamento); e imotilidade (o espermatozoide não tem qualquer movimento);

- **Morfologia:**

A avaliação morfológica é realizada pela observação, ao microscópio, de um esfregaço corado. Esta avaliação consiste na contagem de 200 espermatozoides anormais, isto é, com anomalias a nível da cauda, colo e/ou cabeça.

5. HEMATOLOGIA

O sangue é constituído por uma massa heterogénea de células, incluindo os glóbulos brancos (leucócitos), glóbulos vermelhos (eritrócitos) e plaquetas, e por uma porção líquida denominada de plasma ([Azevedo M, 2019](#)).

A hematologia é a ciência que estuda o sangue, principalmente a hematopoiese e a hemostase. Por outras palavras, é a ciência que estuda a morfologia das células sanguíneas e fisiologia do tecido sanguíneo, bem como, as alterações patológicas reacionais ou onco-hematológicas que envolvem intervenções terapêuticas variadas, como por exemplo o uso de agentes farmacológicos ou transplante de medula óssea ([McPherson R, 2017](#)).

A hematopoiese consiste na origem e formação (proliferação, diferenciação e maturação) das células sanguíneas. Estas são produzidas na medula óssea e lançadas diariamente na circulação sanguínea ([Azevedo M, 2019](#)).

A hemostase corresponde a uma série de processos dentro dos vasos sanguíneos de forma a manter o sangue fluido, quando o vaso é lesionado e se forma um coágulo para parar a hemorragia. O processo de hemostasia é ativado por uma lesão vascular e envolve fases sucessivas e inter-relacionadas entre si, que permitem que não se formem coágulos extensos e a sua eliminação após a reparação do dano. Estas fases incluem:

- Hemostasia primária: vasoconstrição e formação do tampão plaquetário;
- Hemostasia secundária: estabilização do tampão plaquetário pela fibrina;
- Hemostasia terciária: fibrinólise ([Hoffbrand V, 2013](#)).

O laboratório de hematologia (Figura 7), coordenado pela Dr^a Celine Macedo, desempenha um papel fundamental no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças relacionadas com o sangue (principalmente as que afetam a produção dos componentes sanguíneos, como hemofilia, coágulos sanguíneos ou cancro no sangue (leucemia, mieloma múltiplo e linfoma)). A secção é constituída por: duas técnicas superiores de saúde e dois médicos patologistas clínicos.

O laboratório recebe diariamente um grande número de amostras, sendo estas colhidas para tubos distintos de acordo com o estudo pretendido. As amostras, mais frequentes são de sangue venoso, contudo também podem ser de sangue capilar, sangue arterial ou sangue do cordão umbilical, dependendo do que se pretende. Para além disso, estas podem ser colhidas para diferentes tubos, cada um contendo diferentes componentes dependendo da determinação que se pretende realizar. Os tubos que chegam à secção são os que contêm

como anticoagulante EDTA (tampa do tubo rosa) e/ou citrato de sódio (tampa do tubo azul claro).



Figura 7: Setor de hematologia.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

A rotina diária neste setor inicia-se com a verificação e reposição dos reagentes em falta dos equipamentos, bem como, a passagem de controlos pelos mesmos para, aquando da chegada das amostras estar tudo operacional. Quando as amostras chegam ao setor, confirma-se a matrícula e faz-se o seu processamento de acordo com os requisitos da amostra. No final do dia, há sempre a verificação das listas de trabalho e se existem produtos em falta.

As amostras que chegam ao setor podem requerer diversos testes. Com os tubos contendo anticoagulante EDTA realizam-se determinações relacionadas com a hematopoiese, incluindo: determinação do hemograma, determinação da velocidade de sedimentação ou determinação da hemoglobina glicosilada (HbA1c). Nos tubos contendo anticoagulante citrato realizam-se determinação relacionadas com a hemostase através do plasma, incluindo: determinação de fibrinogénio, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de trombina (TT).

Nesta secção, foi-me permitido observar a rotina diária laboratorial e a execução da maioria das tarefas, incluindo: preparação e reposição dos reagentes nos equipamentos; preparação e passagem dos controlos pelos respetivos equipamentos; separação das amostras de acordo com os requisitos (colocando as amostras nos respetivos equipamentos); colorações de Wright; realização de alíquotas; armazenamento das amostras; análise de hemogramas; realização de testes imunocromatográficos; determinação do grupo sanguíneo e teste de Coombs.

5.1. Hemograma

O hemograma, um dos exames laboratoriais mais requeridos, permite avaliar e quantificar as principais linhagens de células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). Sendo ainda, uma forma de diagnóstico de várias doenças (como anemia, infeções e leucemias) e efetuar o controlo evolutivo e terapêutico das mesmas (Hoffbrand V, 2013).

Nesta secção, o hemograma é realizado por um autoanalisador, o Sysmex XN-1000 (Figura 8), através de amostras de sangue total colhido para um tubo com anticoagulante EDTA. A avaliação e determinação dos diversos parâmetros é realizada recorrendo a princípios como:



Figura 8: Equipamento de hemogramas, Sysmex XN-1000.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

▪ Citometria de fluxo por fluorescência (FFC)

Analisa as propriedades fisiológicas e químicas das células, fornecendo informações sobre o tamanho, a estrutura e o interior da célula. No hemograma a FFC é aplicada na contagem de células sanguíneas, como: leucócitos (WBC) e diferencial leucocitário; reticulócitos (RET); fração imatura de reticulócitos (IRF); plaquetas por fluorescência (PLT-F); fração imatura de plaquetas (IPF); eritrócitos nucleados - eritroblastos (NRBC). Este princípio (ver Figura 9) baseia-se na diluição da amostra de sangue para uma proporção predefinida e rotulada com um marcador de fluorescência específico para ácidos nucleicos, após esta ser aspirada e proporcionada. Posteriormente, a amostra é transportada para a célula de fluxo e iluminada por um raio laser semiconductor que, pode separar as células usando três sinais diferentes (como podemos ver na Figura 10): luz dispersa para a frente (dispersão frontal ou FSC) – mede o volume (tamanho) da célula; luz dispersa lateral (dispersão lateral ou SSC) – avalia o conteúdo celular, como núcleo e grânulos; luz de fluorescência lateral

(fluorescência lateral ou SFL) - avalia quantidade de DNA e RNA presente na célula e quantifica os eritroblastos e leucócitos. As células com propriedades físicas e químicas semelhantes formam um aglomerado num gráfico - diagrama de dispersão (McPherson R, 2017; SYSMEX - FFC).

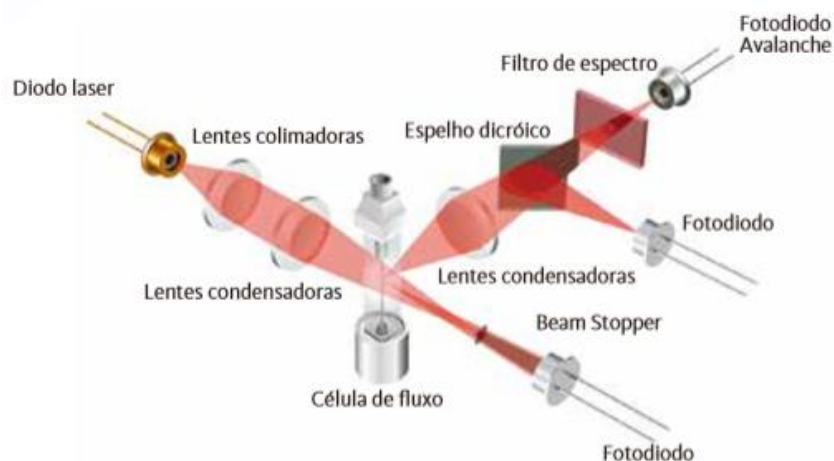


Figura 9: Metodologia de citometria de fluxo por fluorescência.
Adaptado de: (SYSMEX - XN 1000, 2012)

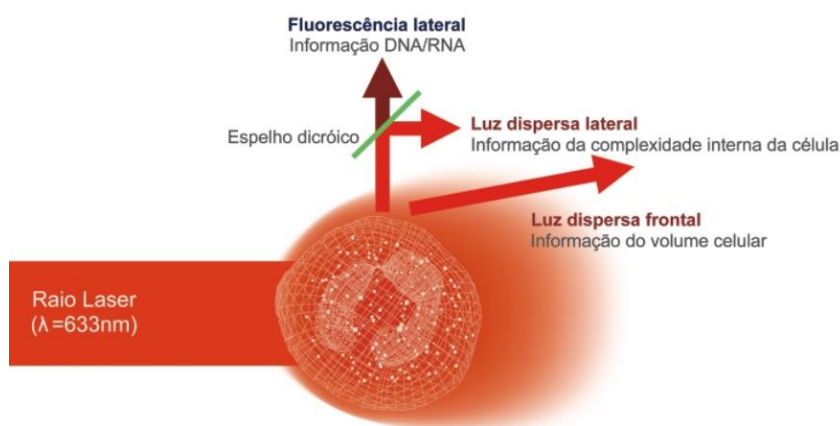


Figura 10: Partícula iluminada por um raio laser semiconductor.
Adaptado de: (SYSMEX - XN 1000, 2012)

▪ Impedância com focagem hidrodinâmica

O método de deteção por impedância combinado com focagem hidrodinâmica minimiza os fenómenos de coincidência e recirculação (ver Figura 11), permitindo a contagem de eritrócitos (RBC), plaquetas (PLT) e hematócrito (HCT). Baseia-se no facto de as células sanguíneas serem más condutoras de eletricidade, permitindo a sua contagem e determinação do seu volume através da impedância. Este princípio recorre a um campo elétrico criado entre dois eléctrodos de carga oposta. As células suspensas numa solução salina condutora passam através da abertura entre os eléctrodos, em que cada célula contribuirá para aumentar momentaneamente a impedância da corrente elétrica entre os eléctrodos. Quando uma célula atravessa a abertura, gera-se uma diferença de potencial

entre os dois elétrodos, que se regista como um impulso. O número de impulsos registados corresponderá ao número de células contadas e a amplitude destes impulsos é diretamente proporcional ao tamanho da célula. O HCT é determinado diretamente através da deteção individual do volume de cada eritrócito. Mesmo com as amostras em concentrações extremamente baixas ou altas, estes analisadores contam os eritrócitos e plaquetas com precisão e exatidão (McPherson R, 2017; SYSMEX - SEED Hematologia, 2012).

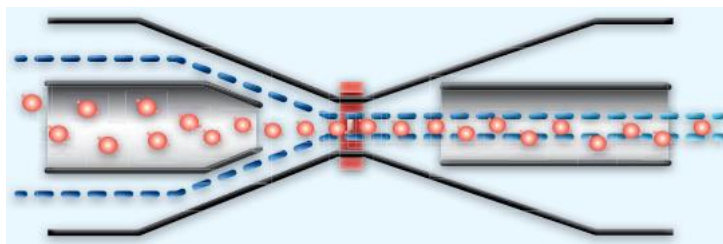


Figura 11: Princípio da impedância com focagem hidrodinâmica.
Adaptado de: (SYSMEX - SEED Hematologia, 2012)

- **Método de lauril sulfato de sódio, livre de cianeto**

Baseia-se num canal separado que, minimizando a interferência de concentrações elevadas de leucócitos, permite a determinação da hemoglobina (Hb). Utiliza lauril sulfato de sódio (SLS) sem cianeto, por forma ao reagente hemolisar os eritrócitos e leucócitos da amostra. A reação química inicia-se com a alteração da globina, oxidando depois o grupo heme. De seguida, o grupo hidrofílico do SLS pode agora ligar-se ao grupo heme, formando um complexo corado (SLS-Hb) (ver Figura 12) que é analisado através de um método fotométrico. Isto é, um LED emite uma luz monocromática e, ao passar pela mistura, a luz é absorvida pelos complexos SLS-Hb e medida por um fotosensor. Os métodos de absorção fotométrica são normalmente influenciados pela turbidez da amostra que, nas amostras de sangue, pode dever-se a lipemia ou a leucocitose. Este método permite minimizar estas interferências devido ao efeito do reagente (McPherson R, 2017; SYSMEX - SLS).

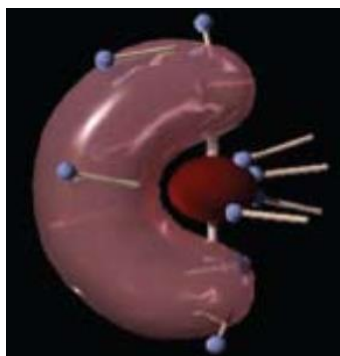


Figura 12: Hemoglobina pelo método Lauril sulfato de sódio.
Adaptado de : (SYSMEX - SLS)

Este equipamento apresenta a grande vantagem de reanalisar automaticamente as amostras para as quais os resultados são considerados duvidosos, reduzindo significativamente intervenções manuais e permitindo a obtenção de resultados confiáveis no menor tempo possível (100 amostras por hora). Adicionalmente, aquando a existência de ‘flags’ ou alteração em algum parâmetro (por exemplo: inversão da forma leucocitária, plaquetas baixas, neutrófila), estes são sinalizados no hemograma por forma a chamar a atenção do analista ([SYSMEX - XN 1000, 2012](#)).

No entanto, existem fontes de erros que devem ser evitadas, por forma a não levarem a resultados falseados ou ao equipamento não conseguir realizar a análise da amostra. Podem ser consideradas fontes de erro: incorreta homogeneização da amostra; amostra com coágulo; presença de crioaglutininas; entre outras.

Os parâmetros avaliados através do XN-1000 incluem ([SYSMEX - XN 1000, 2012](#)):

- **Eritrograma** – Avalia quantitativa e qualitativamente os eritrócitos.
 - Contagem de eritrócitos (RBC)
Os RBC são células anucleadas com forma de disco bicôncavo.
 - Determinação de hematócrito (HCT)
Razão entre o volume de eritrócitos e o volume de sangue total.
 - Concentração de hemoglobina (Hb)
Proteína ligada ao eritrócito envolvida nas trocas gasosas de oxigénio e dióxido de carbono.
 - Volume corpuscular médio (MCV)
Avalia o volume médio dos RBCs. Quando aumentado significa macrocitose, se reduzido significa microcitose. O seu cálculo é efetuado recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{MCV (fL)} = \frac{\text{HCT (L/L)}}{\text{n}^\circ \text{ RBC /L}}$$

- Hemoglobina corpuscular média (MCH)
Avalia a quantidade de hemoglobina no RBC. O seu cálculo é efetuado recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{n}^\circ \text{ RBC /L}}$$

- Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC)

Avalia a concentração média de hemoglobina no RBC e diz-nos se o eritrócito se encontra hipocrómico, normocrómico ou hiperocrómico. O seu cálculo é efetuado recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{HCT (L/L)}}$$

- Coeficiente de variação do volume de eritrócitos (RDW)

Avalia a heterogeneidade do tamanho celular dos eritrócitos.

- Quantificação de eritroblastos (NRBC)

Os eritroblastos são RBC imaturos que, ainda possuem núcleo. Estes são encontrados no sangue em casos de anemia em que, a medula óssea liberta eritroblastos por forma a contrabalançar a falta de RBC no sangue.

- Quantificação de reticulócitos (RET)

Os RET são RBC jovens, de dimensões superiores às dos RBC e que ainda contêm no citoplasma ribossomas e RNA. A sua diminuição no sangue pode ser sinal de anemia (megaloblástica ou ferripriva) ou aplasia medular.

- Percentagem de reticulócitos imaturos (IRF)

- **Leucograma**

- Contagem de leucócitos (WBC)

- Formula leucocitária relativa (%) e absoluta:

- Linfócitos: Célula de dimensões variáveis, núcleo redondo, oval ou reniforme, com cromatina densa e uniforme. Citoplasma de cor azul, podendo apresentar granulações do tipo azurófilo.
- Neutrófilos: Célula com núcleo lobulado e granulações neutrófilas no citoplasma, finas e de cor azul.
- Monócitos: Célula grande com núcleo redondo em ferradura ou enovelado, com uma cromatina pouco densa e aspeto heterogéneo. Citoplasma com granulações do tipo azurófilo e uma tonalidade púrpura.
- Eosinófilos: Célula com núcleo lobulado e granulações eosinófilas que, preenchem quase completamente o citoplasma.
- Basófilos: Célula com núcleo de forma pouco definida, com granulações basófilas, que se distribuem por todo o citoplasma.

- Contagem dos granulócitos imaturos (IG)

- **Plaquetograma**

- Contagem de plaquetas (PLT)

As PLT são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos que, possuem um aspeto achatado.

- Volume plaquetário médio (MPV)

- Plaquetocrito (PCT)

- Amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW)

- Percentual de plaquetas grandes (P-LCR)

- Determinação da fração imatura das plaquetas (IPF)

- **Análise de líquidos biológicos (BF) com diferencial de 2-partes**

- Contagem de eritrócitos nos líquidos biológicos (RBC-BF)

- Contagem de leucócitos nos líquidos biológicos (WBC-BF)

- Diferencial em mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN)

- Contagem total nos líquidos biológicos (TC-BF)

O equipamento, para além de todas as características apresentadas anteriormente, ainda utiliza uma metodologia que inclui, lise celular específica e coloração fluorescente que, permite uma avaliação detalhada da morfologia celular (SYSMEX - XN 1000, 2012). Ou seja, apresenta melhorias nos canais comparativamente a outros equipamentos, as quais saliento a seguir:

- **Canal WNR**

Avalia e quantifica os eritroblastos e os leucócitos (Figura 13), através da citometria de fluxo fluorescente com corante de polimetina específico para ácidos nucleicos e lise celular específica, sem interferência de lípidos ou eritrócitos resistentes à lise. O analisador deste canal recorre à fluorescência lateral e à dispersão frontal de luz (SYSMEX - XN 1000, 2012).

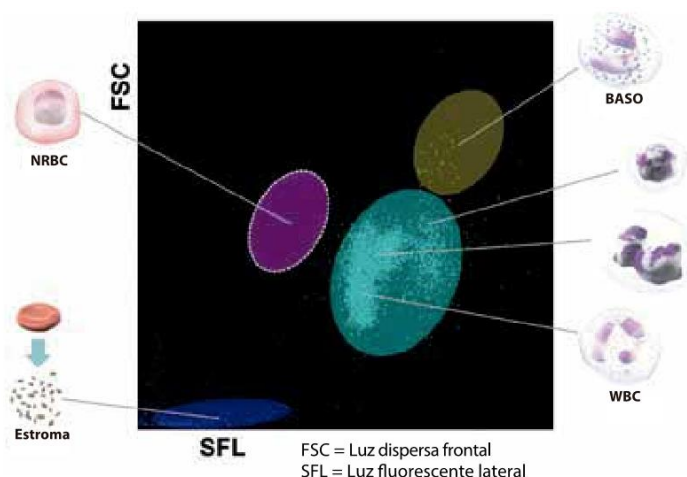


Figura 13: Representação do canal WNR. Adaptado de: (SYSMEX - XN 1000, 2012)

- **Canal WDF**

Avalia e quantifica leucócitos e granulócitos imaturos para todas as diferenciais leucocitárias (Figura 14), através de citometria de fluxo fluorescente e do algoritmo adaptável de alarmes Sysmex baseado no reconhecimento da forma da área da população celular (SAFLAS). Além disso, ainda apresenta uma melhor sensibilidade e especificidade na discriminação entre monócitos, linfócitos, linfócitos atípicos e blastos (SYSMEX - XN 1000, 2012).

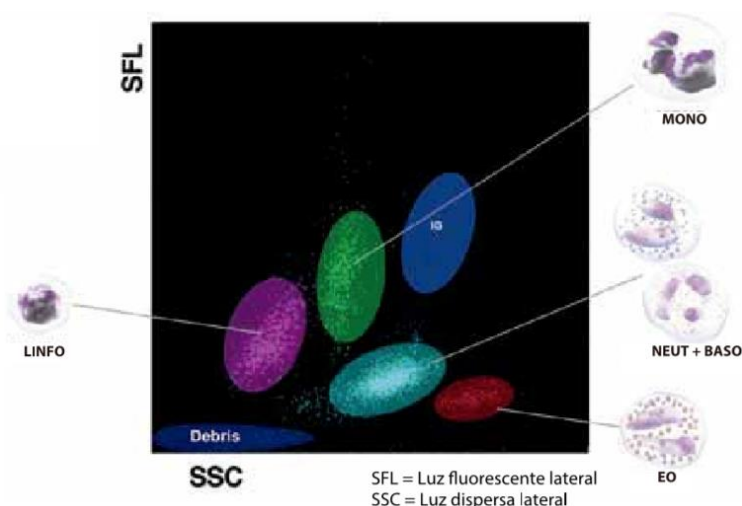


Figura 14: Representação do canal WDF. Adaptado de: (SYSMEX - XN 1000, 2012)

- **Canal PLT-F**

Identifica e quantifica as plaquetas e analisa o grau de imaturidade destas (Figura 15), através de citometria de fluxo fluorescente com corante específico para plaquetas - a Oxazina. Este corante também ajuda a minimizar as interferências causadas por fragmentos eritrocitários, micrócitos e fragmentos de leucócitos. Contudo, este canal só é utilizado quando o método por impedância não garante a precisão da contagem de plaquetas, sendo que, a medição por fluorescência aumenta a quantidade de células contadas até 6 vezes. O parâmetro IPF permite avaliar diretamente a trombopoiese (SYSMEX - XN 1000, 2012).

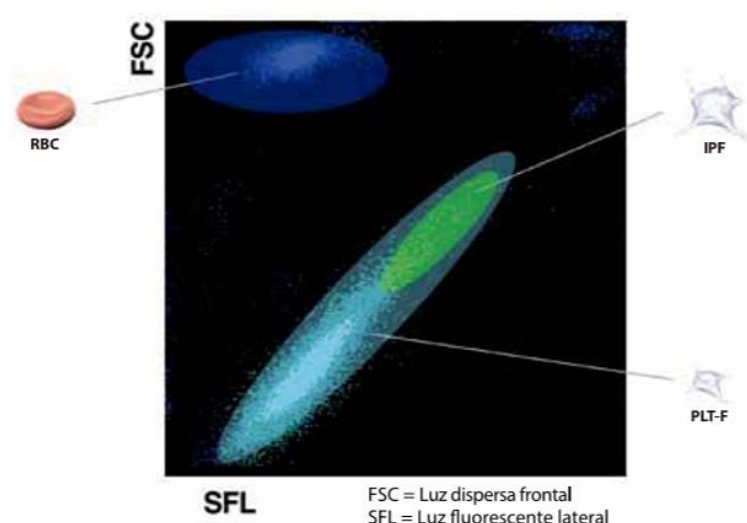


Figura 15: Representação do canal PLT-F. Adaptado de:
(SYSMEX - XN 1000, 2012)

▪ Canal RET

Fornece informações quantitativas e qualitativas que permitem uma avaliação celular completa da eritropoiese, através de luz dispersa frontal e fluorescência lateral. Os parâmetros obtidos são: RET, IRF e conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos (RET-Hb) (Figura 16) (SYSMEX - XN 1000, 2012).

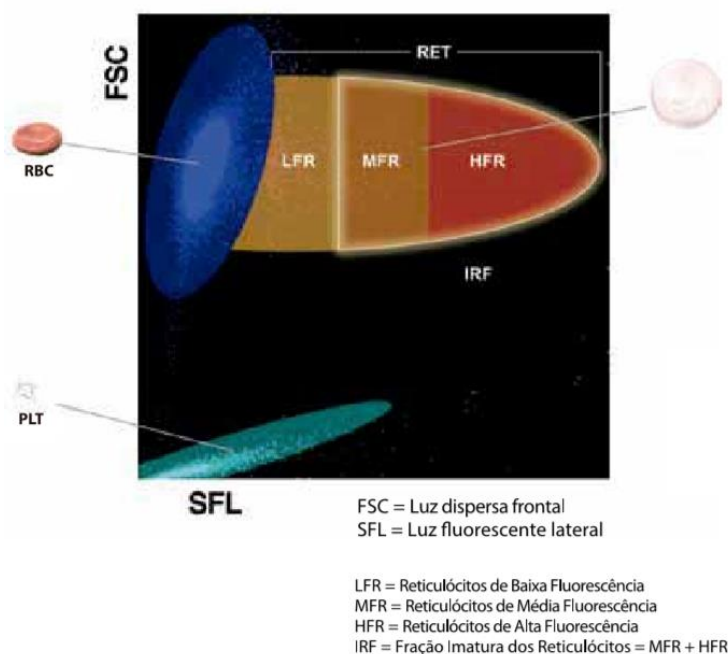


Figura 16: Representação do canal RET. Adaptado de:
(SYSMEX - XN 1000, 2012)

- **Diferencial de 2-partes em todas as análises de líquidos biológicos**

Fornece a contagem de RBC-BF, WBC-BF e diferencial (mononucleares e polimorfonucleares) e a TC-BF em amostras de líquidos biológicos (como: LCR, líquido sinovial, secreções serosas) (Figura 17), através de citometria de fluxo por fluorescência (SYSMEX - XN 1000, 2012).

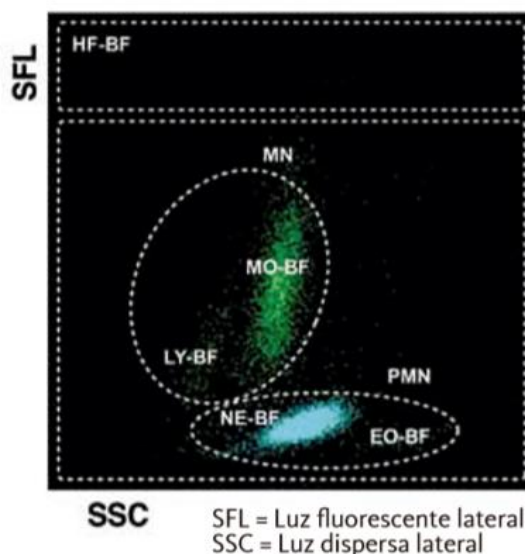


Figura 17: Representação do canal diferencial de 2-partes em líquidos biológicos.

Adaptado de: (SYSMEX - XN 1000, 2012)

Contudo, quando são obtidos resultados fora do valor de referência estipulado é necessário a realização de um esfregaço sanguíneo com o objetivo de confirmar o valor obtido através do hemograma. O esfregaço é realizado pelo método manual a partir de uma amostra de sangue total colhida para um tubo com anticoagulante EDTA e corado posteriormente segundo a coloração de Wright.

A preparação do esfregaço consiste em colocar diretamente sobre uma lâmina de vidro uma gota de sangue e espalhá-la numa camada fina pela sua superfície com o auxílio de outra lâmina (como podemos ver na Figura 18).

Quando o esfregaço estiver seco, procede-se à sua coloração. A coloração de Wright é uma técnica que utiliza uma combinação ácido (eosina)/base (azul de metileno) e, tem como finalidade a diferenciação dos diferentes tipos de células sanguíneas. Esta coloração consiste basicamente na aplicação do corante durante 10 minutos, posteriormente colocam-se umas gotas de água destilada durante mais 10 minutos e por fim lava-se a lâmina.

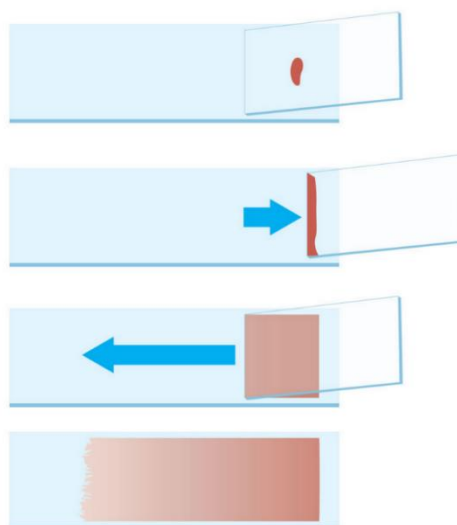


Figura 18: Técnica do esfregaço sanguíneo.

Por fim, realiza-se a observação ao microscópio do esfregaço corado, tendo-se em atenção possíveis alterações ou anormalidades nas células sanguíneas que, quando observadas podem ser sinal de doença, como: anemia; leucemia; linfomas; insuficiência da medula óssea; entre outras (Azevedo M, 2019).

A nível de controlos de qualidade, diariamente e, antes do início da rotina diária, são passados os controlos internos e mensalmente são passados controlos externos. Os controlos internos correspondem a três amostras de sangue (nível baixo, normal e alto) humano modificado e estabilizado que vem com o equipamento de forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento. Os controlos externos, NEQAS, têm por objetivo de monitorizar o desempenho do laboratório, avaliando e verificando se os resultados obtidos estão em conformidade com os obtidos nos restantes laboratórios. Estes são também constituídos por três amostras: nível baixo, normal e alto.

5.2. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS), consiste na determinação do tempo que os eritrócitos em repouso demoram a sedimentar num determinado período de tempo (mm/hora). A VS é uma análise de rotina por se encontrar alterada em diversas situações, das quais processos infecciosos e inflamatórios em atividade, permitindo estudar a evolução e a resposta terapêutica nessas situações. Este parâmetro é realizado a partir de uma amostra de sangue venoso colhido para um tubo com anticoagulante EDTA.

Diversos fatores, intrínsecos e extrínsecos, podem influenciar a VS, dos quais: modificações no número, forma ou dimensões dos eritrócitos; alterações na composição plasmática; grau

de anemia; presença de algumas patologias, como neoplasias; medicação; variações de temperatura; má homogeneização ou amostra com coágulo ([Azevedo M, 2019](#)).

A VS pode ser determinada pelo método manual ou automaticamente recorrendo a equipamentos como o VES-MATIC CUBE 80 da Diesse (Figura 19). Este analisador automático de bancada pode analisar até 95 amostras de sangue por hora. A principal inovação é que a sedimentação dos eritrócitos no plasma é lida diretamente nos tubos originais de EDTA, por meio de um sistema ótico especialmente projetado. Devido a esse recurso, nenhuma parte do sistema entra em contacto com as amostras de sangue durante a sua operação, pelo que, não há transferência de sangue do tubo original para nenhuma parte do analisador e não há produção de fluidos residuais. A análise das amostras é executada de forma totalmente automática (mistura das amostras e leitura da sedimentação) e os resultados, obtidos em apenas 20 minutos, correlacionam-se com os obtidos pelo método padrão de Westergren (sedimentação de 60 minutos realizada a 18 °C usando pipetas de vidro) ([DIESSE](#)).



Figura 19: Equipamento da VS, VES-MATIC CUBE 80.
Adaptado de: ([DIESSE](#))

A nível de controlos de qualidade, diariamente e, antes do início da rotina diária, são passados os controlos internos e mensalmente são passados controlos externos. Os controlos internos correspondem a duas amostras de sangue (uma de nível normal e outra de nível anormal) humano modificado e estabilizado que vem com o equipamento de forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento. Os controlos externos, NEQAS, têm por objetivo de monitorizar o desempenho do laboratório, avaliando e verificando se os resultados obtidos estão em conformidade com os obtidos nos restantes laboratórios. Estes são também constituídos por duas amostras, uma do nível normal e outra do nível anormal.

5.3. Hemoglobina glicosilada

A medição da HbA1c é um meio clínico útil para avaliar o controlo glicémico e a eficácia geral da terapêutica em diabéticos, para além de se encontrar relacionada com a diabetes *mellitus*. Os valores da HbA1c refletem os níveis de glicose no sangue durante a meia-vida circulatória do eritrócito e estão correlacionados com os níveis de glicose no sangue durante esse período. Fatores tais como dieta, exercício, regime de insulina e stress podem afetar os valores da HbA1c. A manutenção de um bom controlo glicémico tem um impacto positivo no desenvolvimento de complicações de longo prazo associadas à diabetes (A.Menarini Diagnostics).

As proteínas glicosiladas (hemoglobinas e proteínas do plasma) diferem das proteínas não glicosiladas por conterem grupos 1,2-cis-diol. Estes grupos diol formam a base de separação dos componentes glicosilados e não glicosilados por cromatografia de afinidade borónica. Esta técnica tem por base a aderência do boronato, ou ácido fenilborónico, à superfície do suporte da coluna que, retém o componente glicosilado, eluído posteriormente da coluna com um reagente que o separa do boronato (como podemos ver na Figura 20).

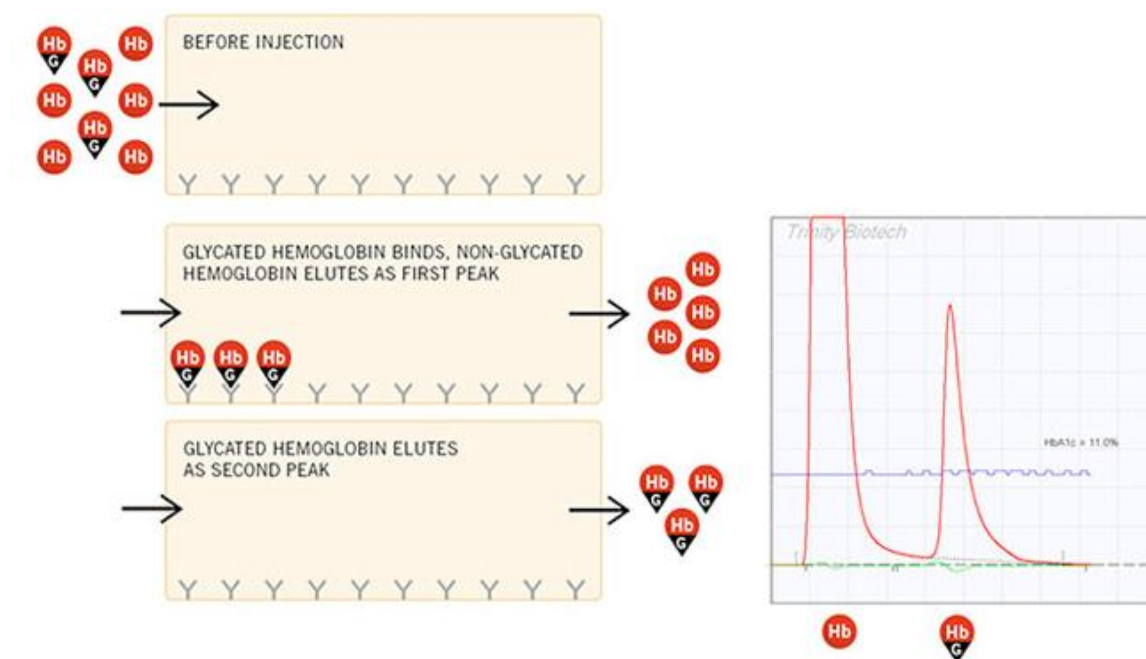


Figura 20: Diagrama de ligação da HbA1c e respetivo gráfico das concentrações de hemoglobina glicosilada e não glicosilada. Adaptado de: (A.Menarini Diagnostics)

A monitorização da HbA1c é realizada recorrendo ao analisador Hb9210 Premier da Menarini Diagnostics (Figura 21). Este analisador recorre aos princípios da afinidade borónica e da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), usando amostras de sangue venoso colhido para um tubo com anticoagulante EDTA. Todas as funções do analisador são controladas através de um computador e, é este que processa o sinal do detetor espectrofotométrico e calcula a concentração de HbA1c ([A.Menarini Diagnostics](#)).



Figura 21: Equipamento de HbA1c, Hb9210 Premier da Menarini Diagnostics.
Adaptado de: ([A.Menarini Diagnostics](#))

A nível de controlos de qualidade, diariamente e, antes do início da rotina diária, os controlos são reconstituídos e passados no analisador e, mensalmente são passados controlos externos. Os controlos internos correspondem a duas alíquotas reconstituídas, uma de nível normal e outra de nível elevado (diabético) por forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento. Os controlos externos, NEQAS, têm por objetivo de monitorizar o desempenho do laboratório, avaliando e verificando se os resultados obtidos estão em conformidade com os obtidos nos restantes laboratórios. Estes são também constituídos por duas alíquotas reconstituídas, uma do nível normal e outra do nível elevado (diabético).

Para além dos controlos de qualidade, é essencial garantir a calibração do equipamento, sendo esta realizada através da reconstituição de duas alíquotas, uma do nível normal e outra do nível elevado (diabético). O equipamento apenas tem de ser calibrado quando: o instrumento é instalado inicialmente; uma coluna é trocada; os valores dos controlos dão fora do intervalo aceitável; o material de referência sofre alterações de valores ou número de lote.

5.4. Hemostase

A hemostase pode ser considerada um equilíbrio entre as proteínas de coagulação e anticoagulação aliados a um processo de fibrinólise que, permitem manter a fluidez do sangue pelos vasos, o controlo da hemorragia e a dissolução do coágulo. Além disso, a resposta hemostática perante uma lesão vascular depende da interação entre a parede do vaso sanguíneo, plaquetas e fatores de coagulação. Alterações neste equilíbrio pode levar a certas patologias, das quais: hemofilia e trombofilia (Hoffbrand V, 2013).

- **Hemostasia primária: vasoconstrição e formação do tampão plaquetário**

Consiste num trabalho conjunto entre os vasos sanguíneos (que levam à vasoconstrição) e as plaquetas (que formam um tampão plaquetário). A vasoconstrição resultante da lesão de um vaso sanguíneo é responsável pela diminuição do fluxo sanguíneo na região lesionada, permitindo o controlo da hemorragia. A diminuição do fluxo sanguíneo leva à ativação das plaquetas e fatores de coagulação que, por sua vez, se agregam no local da lesão. A continua agregação de plaquetas leva à formação de um tampão plaquetário (Hoffbrand V, 2013).

- **Hemostasia secundária: estabilização do tampão plaquetário pela fibrina**

O tampão plaquetário é transformado numa massa gelatinosa (tampão hemostático) através da formação de um trombo plaquetário e de uma rede de fibrina. A fibrina é formada através da conversão do fibrinogénio por meio da cascata de coagulação. Cascata esta ativada quando o fator tecidual (TF) é ativado e, por sua vez, ativa o fator VII (proconvertina). Após ativação da cascata de coagulação, ocorre uma série de reações até se obter a fibrina (ver Figura 22), ou seja: o fator VIIa (TF+VII) liga-se ao fator IX (fator Christmas) e ativam o fator X (fator Stuart). O fator Xa liga-se ao fator II (protombrina) para formar a trombina. Por sua vez, a trombina converte o fibrinogénio (fator I) em fibrina. A fibrina, uma proteína insolúvel, precipita e forma uma rede de filamentos. Esta rede de filamentos, juntamente com o trombo plaquetário, dá origem ao tampão hemostático que, obstrui o vaso danificado e estanca o sangramento (Hoffbrand V, 2013).

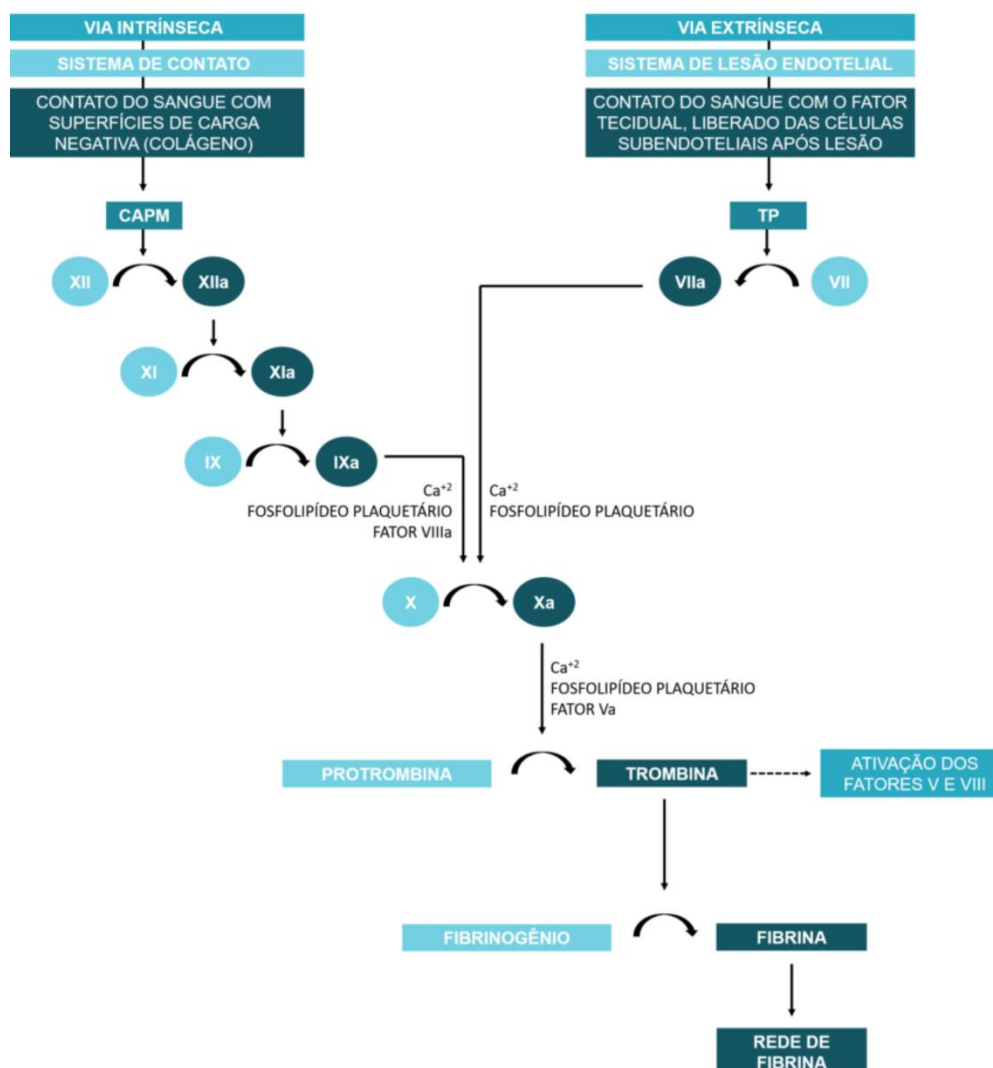


Figura 22: Esquema representativo da cascata de coagulação.

Adaptado de: (Hoffbrand V, 2013)

▪ Hemostasia terciária: fibrinólise

A fibrinólise corresponde ao processo através do qual o coágulo de fibrina é destruído e o fluxo sanguíneo reativado (Figura 23). Ou seja, a fibrina é degradada pela plasmina, obtida através da conversão do plasminogénio – enzima sintetizada pelo fígado (Hoffbrand V, 2013).

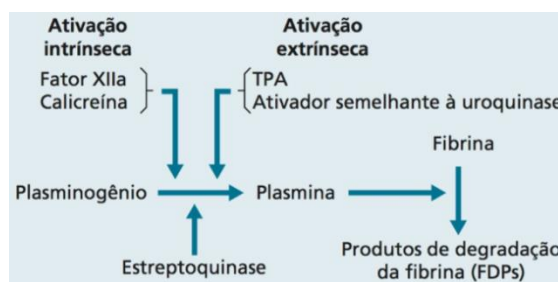


Figura 23: Fibrinólise. Adaptado de: (Hoffbrand V, 2013)

Os parâmetros essenciais para a avaliação da hemostase são realizados pelo analisador de coagulação totalmente automatizado, o Sysmex CS-2500 System (Figura 24), através de amostras de sangue total colhido para um tubo com anticoagulante citrato de sódio na porção de 1/10 (amostras estas centrifugadas durante 10 minutos a 3500 rpm (rotações por minuto) antes de entrarem no analisador)) (SIEMENS - CS 2500).

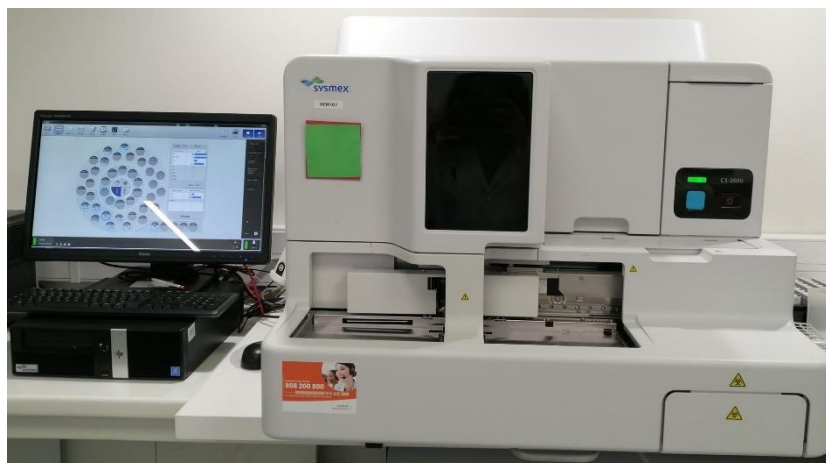


Figura 24: Equipamento de hemostase, Sysmex CS-2500 System.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

Este equipamento permite a avaliação de diversos parâmetros da hemostasia de rotina e especializados, incluindo (Hoffbrand V, 2013; SIEMENS - CS 2500):

- **TP**

Avalia os fatores da via extrínseca (fatores II, V, VII, X) e o fibrinogénio. Este teste consiste na adição de tromboplastina tecidual e cálcio ao plasma citratado do utente. Posteriormente, mede-se o tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina. O tempo normal de coagulação é de 10 a 14 segundos. O resultado pode ser expresso em segundos, percentagem do valor normal, rácio de protrombina (RP) – divide-se o tempo de reação da amostra pelo tempo de reação do plasma normal - ou Rácio Normalizado Internacional (INR) – obtido recorrendo-se ao Índice Internacional de Sensibilidade (ISI) que, converte o RP em valores internacionais comparáveis.

- **TTPA**

Avalia os fatores VIII, IX, XI e XII, para além dos fatores X, V, protrombina e fibrinogénio. Este teste consiste na adição de fosfolípidos, de um ativador de superfície - que leva à ativação dos fatores do sistema de coagulação endógenos - e cálcio ao plasma citratado do utente. Posteriormente, mede-se o tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina. O tempo normal de coagulação é de 30 a 40 segundos.

- **Fibrinogénio**

Determina quantitativamente o fibrinogénio no plasma. Este teste consiste na adição de trombina – enzima que converte o fibrinogénio (que é solúvel) no seu polímero insolúvel, a fibrina – e posterior medição do tempo de coagulação do plasma diluído. O tempo de coagulação é então comparado com o tempo de coagulação de uma amostra de fibrinogénio standardizada. O tempo de coagulação do plasma diluído é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio no plasma. A concentração normal de fibrinogénio no plasma é de 1.8 a 3.5 g/L.

- **TT**

Determina o tempo de trombina no plasma. Este teste consiste na adição de trombina bovina diluída ao plasma citratado e posterior medição do tempo que demora até à formação do coágulo. O tempo normal de coagulação é de 14 a 21 segundos.

A avaliação e determinação dos diversos parâmetros é realizada recorrendo a princípios como ([McPherson R, 2017](#); [SIEMENS - CS 2500](#)):

- **Coagulometria**

Baseia-se no método de deteção por turbidimetria, isto é, na medição da turvação. Por este método, mede-se o tempo que demora a formar-se o coágulo de fibrina, que é posteriormente detetado por turbidimetria. A formação do coágulo leva a um aumento da turvação e por sua vez à redução da quantidade de luz transmitida.

- **Método cromogénico**

Recorre a reações cromogénicas, ou seja, os analitos são medidos enzimaticamente com recurso a substratos cromogénicos. Baseia-se na formação de um pigmento aquando a presença do analito alvo. Após a formação do pigmento é medida a absorvância da solução através do método de fotometria em que, a concentração do analito é obtida recorrendo a uma curva de calibração.

- **Imunoturbidimetria**

- **Fotometria**

Baseia-se na quantidade de luz absorvida por uma dada substância em solução quando esta é atravessada por um feixe de luz com um dado comprimento de onda. A fração de luz

transmitida é então detetada por um foto-detetor, permitindo a determinação da concentração do analito em questão.

A nível de controlos de qualidade, diariamente e, antes do início da rotina diária, os controlos internos são passados pelo analisador e, mensalmente são passados os controlos externos. Os controlos internos correspondem a duas amostras de plasma, uma de nível normal (nível 1) e outra de nível patogénico (nível 3) por forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento.

5.5. Grupos sanguíneos

Existem diversos grupos sanguíneos descritos, contudo o sistema ABO e o sistema Rhesus (Rh) são os de maior importância devido ao risco de poderem ocorrer complicações transfusionais e incompatibilidade materno-fetal.

O sistema ABO é definido por três genes alelos (A, B e O) em que, o gene A adiciona N-acetilgalactosamina na substância H existente a nível da membrana eritrocitária, o gene B adiciona D-galactose e o gene O é amorfo, ou seja, não tem nenhum carboidrato adicionado à substância H. Este sistema também se caracteriza pela presença de anticorpos naturais dirigidos aos antígenos ausentes na membrana eritrocitária, isto é, existem anticorpos anti-A e/ou anti-B no soro de um indivíduo cujos eritrócitos não possuem o antígeno A e/ou B.

O Rh é definido por dois grupos de genes, contudo, apenas o antígeno D (RhD) tem importância clínica e consiste na determinação se um indivíduo possui este antígeno ou não (se é Rh positivo ou Rh negativo, respetivamente). Este sistema caracteriza-se pela ausência de anticorpos naturais, sendo produzidos apenas quando é introduzido o antígeno D no sangue de um indivíduo que não o possua (Rh negativo).

Assim, é necessário identificar corretamente não só o grupo sanguíneo ABO como o fator Rh de cada indivíduo. Esta identificação é feita através de reações de aglutinação entre eritrócitos e anticorpos dirigidos para os antígenos presente na membrana eritrocitária (Hoffbrand V, 2013).

A determinação dos grupos sanguíneos ABO com determinação dupla de Rh é realizada recorrendo ao Card-ID 'DiaCLON ABO/D' da BIO-RAD usando amostras de sangue total colhidas em tubos contendo anticoagulante EDTA ou citrato. Este Card permite determinar o perfil ABO/RhD com confirmação do RhD (Figura 25) (BIO-RAD: Card-ID ABO/D).

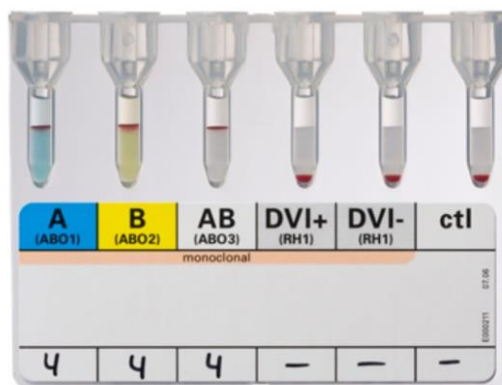


Figura 25: Exemplo de um Card-ID 'DiaCLON ABO/D' da BIO-RAD.

Adaptado de: [\(BIO-RAD: Card-ID ABO/D\)](#)

Adicionalmente, o teste de Coombs (teste antiglobulina) também é amplamente utilizado na sorologia de grupos sanguíneos. Este teste avalia a presença de anticorpos específicos que provocam a destruição dos eritrócitos, causando anemia. A pesquisa de anticorpos, é realizada recorrendo ao Card-ID 'LISS/Coombs + Enzyme Test' da BIO-RAD (Figura 26) usando amostras de sangue total colhidas em tubos contendo anticoagulante EDTA ou citrato. Este Card permite a pesquisa de anticorpos de um dador ou doente através de uma reação usando a antiglobulina humana (AGH) e o teste enzimático – que permite aumentar a sensibilidade do teste [\(BIO-RAD: Card-ID LISS/Coombs\)](#).

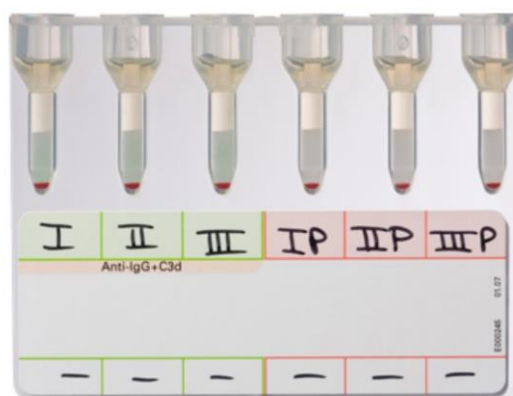


Figura 26: Exemplo de um Card-ID 'LISS/Coombs + Enzyme Test' da BIO-RAD.

Adaptado de: [\(BIO-RAD: Card-ID LISS/Coombs\)](#)

5.6. Teste imunocromatográfico

O *Plasmodium* spp. é um género de parasitas protozoários unicelulares das células sanguíneas (principalmente eritrócitos) e, são transmitidos aos humanos pela picada mosquitos *Anopheles*. Existem quatro espécies de *Plasmodium* que infetam humanos - *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum* - e desencadeiam diferentes formas de malária.

O diagnóstico e controlo terapêutico das infeções por *Plasmodium* spp. é realizado através de um teste imunocromatográfico (teste rápido), o OptiMAL-IT da BIO-RAD. Este teste utiliza anticorpos monoclonais contra a enzima metabólica lactato desidrogenase do parasita (pLDH) que, permite (BIO-RAD: OptiMAL-IT, 2015):

1. Identificar a presença ou ausência do *Plasmodium* spp.
2. Diagnóstico diferencial das espécies em *Plasmodium falciparum* ou nas outras três espécies (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) (Figura 27).

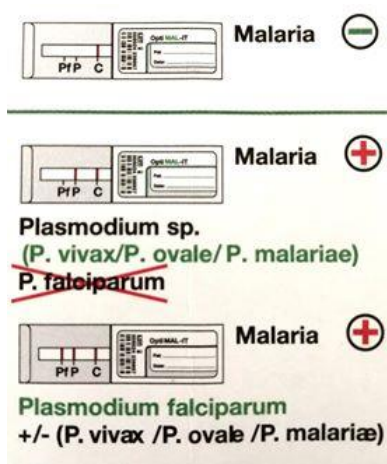


Figura 27: Resultados possíveis através do teste OptiMAL-IT da BIO-RAD.
Adaptado de: (BIO-RAD: OptiMAL-IT, 2015)

6. BIOQUÍMICA

A bioquímica é uma ciência que se baseia no estudo e modificação da estrutura molecular e das reações químicas do metabolismo de biomoléculas, componentes celulares e virais, como proteínas, enzimas, carboidratos, lípidos, ácidos nucleicos, entre outros. Adicionalmente, também se dedica à monitorização de fármacos e ao rastreio de drogas de abuso na urina (toxicologia), bem como ao estudo de hemoglobinopatias e parâmetros relacionados com o stress oxidativo (Ahmed N, 2017).

O laboratório de bioquímica (ou química) em junção com o de imunologia (Figura 28) é coordenado pelo Dr. Miguel Gomes e, desempenha um papel fundamental na determinação de muitos analitos úteis no diagnóstico, tratamento e monitorização de doenças associadas. As duas secções em conjunto são constituídas por: quatro técnicos superiores de saúde e um médico patologista clínico.



Figura 28: Uma parte do setor de bioquímica e imunologia.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

O setor recebe diariamente inúmeras amostras, das quais: sangue total colhido em tubos sem anticoagulante com gel (soro), sangue arterial em seringas com heparina e urina em tubos apropriados. Tanto os soros como as urinas, antes de chegarem ao setor são previamente centrifugadas a 4500 rpm durante 10 minutos. As amostras podem requerer diversos testes, isto é: com os soros realizam-se determinações bioquímicas e/ou proteínogramas; com as urinas realizam-se determinações bioquímicas; e com as seringas com heparina realizam-se gasimetrias.

A rotina diária neste setor inicia-se com a verificação e reposição dos reagentes em falta dos equipamentos, bem como, a passagem de controlos e calibradores pelos mesmos para, aquando da chegada das amostras estar tudo operacional. Antes da chega das amostras ainda se verifica se os requisitos das amostras processadas nos últimos dois dias estão realizados e descartamos as amostras num recipiente apropriado. Quando as amostras

chegam ao setor, confirma-se a matrícula e faz-se o seu processamento de acordo com os requisitos da amostra. No final do dia, há sempre a verificação das listas de trabalho e se existem produtos em falta, bem como o armazenamento das amostras do dia.

Nesta secção, foi-me permitido observar a rotina diária laboratorial e a execução da maioria das tarefas, incluindo: reposição dos reagentes nos equipamentos; preparação e passagem dos controlos e calibradores pelos respetivos equipamentos; separação das amostras de acordo com os requisitos (colocando as amostras nos respetivos equipamentos); armazenamento e eliminação das amostras; análise dos valores dos controlos; gasimetrias e cálcio ionizado.

6.1. Determinações bioquímicas

As determinações bioquímicas permitem avaliar e quantificar inúmeros parâmetros fundamentais no diagnóstico, tratamento e monitorização de diversas patologias. Patologias essas evidenciadas através do enquadramento global e clínico dos diversos parâmetros, como: perfil hepático (fígado); perfil renal (rins); perfil pancreático (pâncreas); perfil lipídico; perfil endócrino (glândulas); ionograma (eletrólitos); entre outros.

Nesta secção, as determinações bioquímicas são realizadas por um autoanalisador fotométrico, o ADVIA 1800 Chemistry System (Figura 29), através de soro ou urina. Apresenta um rendimento de 1800 testes por hora e a capacidade de manter os controlos e reagentes refrigerados para uma maior estabilidade e produtividade ([SIEMENS - ADVIA 1800](#)).



Figura 29: Equipamento de determinações bioquímicas, ADVIA 1800 Chemistry System da Siemens.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

A avaliação e determinação dos diversos parâmetros é realizada recorrendo a princípios como:

- **Colorimetria**

Um dos métodos mais usados na bioquímica clínica e que se baseia numa análise quantitativa realizada pela comparação da cor produzida por uma reação química com uma cor padrão. Recorre ao uso de um espectrofotómetro e, assenta no princípio de que quando a luz branca passa através de uma solução colorida, alguns comprimentos de onda são mais absorvidos do que outros (como demonstrado na Figura 30). Assim, a concentração do analito será proporcional à intensidade da cor absorvida (McPherson R, 2017; Ochei J, 2000).



Figura 30: Representação esquemática do método colorimétrico.
Adaptado de: (McPherson R, 2017)

- **Imunoturbidimetria**

A turvação de uma amostra leva à diminuição da intensidade de um feixe de luz quando este a atravessa. A turbidimetria baseia-se na medição da luz transmitida, ou seja, na medição da diminuição da intensidade da luz incidente causada por fenómenos de dispersão, reflexão e absorção do feixe de luz pela amostra.

A imunoturbidimetria baseia-se na medição da formação de imunocomplexos antígeno (Ag)/anticorpo (Ac). Estes imunocomplexos levam à turvação da amostra que, faz com que a intensidade do feixe de luz incidente que atravessa a amostra seja menor (ver Figura 31). Assim, a quantidade de luz que passa através da amostra será inversamente proporcional à concentração de antígeno (Hall A, 2010; McPherson R, 2017).

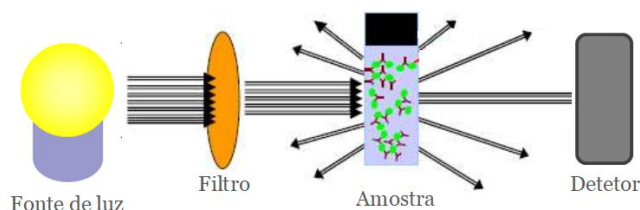


Figura 31: Representação esquemática do método imunoturbidimétrico.
Adaptado de: (McPherson R, 2017)

- **Eléttodos ião-seletivo (ISE)**

Baseia-se na medição da concentração de eletrólitos, dos quais: sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-). Este método integra eléctrodos de membrana éter-coroa para o Na^+ e o K^+ , uma membrana de PVC orientada a nível molecular para o Cl^- e um eléctrodo de prata/cloreto de prata correspondente ao eléctrodo de referência. Cada ião específico desenvolve um potencial eléctrico que, é convertido em voltagem e que, por sua vez, é convertido na concentração de iões da amostra (McPherson R, 2017).

Os parâmetros avaliados através deste autoanalisador, incluem (SIEMENS - ADVIA 1800):

- **Perfil lipídico:**
Colesterol; colesterol LDL; colesterol HDL; triglicerídeos;
- **Perfil pancreático:**
Amílase; lipase;
- **Perfil hepático:**
Alanina aminotransferase (ALT); aspartato aminotransferase (AST); gama-glutamilttransferase (γ -GT); fosfatase alcalina (ALP); lactato desidrogenase (LDH); bilirrubina direta e total; glicose; albumina;
- **Função renal:**
Creatinina; ureia; ácido úrico; microalbumina; albumina;
- **Marcadores cardíacos:**
Creatina quinase;
- **Ionograma:**
Cálcio; cloreto; magnésio; fósforo; potássio; sódio;
- **Proteínas específicas:**
Proteína C reativa (PCR); ferritina; fator reumatoide; transferrina; proteína total (soro, LCR/urina);
- **Monitoramento de medicamentos terapêuticos:**
Digoxina.

Diariamente e, antes do início da rotina diária, é de extrema importância a passagem de controlos de qualidade internos e calibradores pelo analisador, por forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento e, mensalmente de controlos externos. Os controlos internos incluem (SIEMENS - ADVIA 1800):

- **Unassayed Chemistry Control (Human) – nível 1 e nível 2**
Controla parâmetros como: triglicerídeos; ácido úrico; ureia; clorídeo; LD; ferro; magnésio; potássio; fosfato; sódio; CK; creatinina; GGT; glicose; cálcio; HDL; LDL;

colesterol total; amílase pancreática; AST; bilirrubina direta e total; albumina; fosfatase alcalina;

- **Cardiac Markers Control** – nível 1b e **Elevated CRP Control** – nível 2
Controla a PCR;
- **Quantitative Urine Control** – nível 1 e nível 2
Controla parâmetros como: cálcio; proteínas totais; sódio; ureia; ácido úrico; clorídeo; potássio; creatinina; fosforo; microalbumina; magnésio;
- **Immunology Control** - nível 1 e nível 3
Controla parâmetros como: fator reumatoide; CRP; transferrina; antistreptolisina O;
- **Imunoassay** - nível 1 e nível 2
Controla a digoxina;

Os controlos externos, NEQAS, têm por objetivo de monitorizar o desempenho do laboratório, avaliando e verificando se os resultados obtidos estão em conformidade com os obtidos nos restantes laboratórios. Estes são constituídos por duas alíquotas reconstituídas, uma do nível normal e outra do nível elevado.

Para além dos controlos de qualidade, é essencial garantir que todos os parâmetros estão devidamente calibrados, sendo apenas necessária a calibração quando: o instrumento é instalado inicialmente; os valores dos controlos dão fora do intervalo aceitável; o material de referência sofre alterações de valores ou número de lote. Adicionalmente, é necessário ter em atenção que os calibradores podem ser de um ponto (usa apenas um ponto, construindo uma reta) ou multiponto (usa seis pontos, construindo uma curva de calibração). Assim e, de acordo com os parâmetros em causa vamos ter diferentes calibrados, incluindo ([SIEMENS - ADVIA 1800](#)):

- **ISE serum/urine standart set**
Calibra o sódio, potássio e cloreto;
- **Chemistry calibrator**
Calibra os parâmetros da química em geral;
- **LPS calibrator**
Calibra a antistreptolisina O, transferrina e fator reumatóide;
- **Enzyme 1 calibrator**
Calibra a γ -GT, lípase e LDH;
- **Enzyme 2 calibrator**
Calibra a ALT e AST;

- **HDL/LDL cholesterol calibrator**

Calibra o HDL e LDL;

- **wPCR calibrator**

Calibra a proteína C reativa;

- **TDM calibrator**

Calibra a digoxina;

- **UALB-2 calibrator**

Calibra a microalbumina;

- **UPRO calibrator**

Calibra as proteínas na urina;

- **ALP-2 calibrator**

Calibra a ALP.

6.2. Proteínograma

O plasma sanguíneo é composto fundamentalmente por água (90%) e proteínas (7%). As proteínas plasmáticas são essenciais para o bom funcionamento do organismo humano devido às suas inúmeras funções, tais como: manutenção da pressão osmótica; transporte de hormonas, vitaminas, metais e drogas (podendo servir como reservatórios); defesa (através das imunoglobulinas e complementos); coagulação e fibrinólise.

A proteína mais abundante no plasma é a albumina e, é responsável pela pressão osmótica, transporte de moléculas (como: bilirrubina, ácidos gordos, cálcio, magnésio, cobre, cortisol) e é uma fonte de aminoácido. Para além desta, existem outras proteínas no plasma que são igualmente importantes, como é o caso das globulinas: α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas (das quais faz parte o fibrinogénio) e γ -globulinas (que incluem as imunoglobulinas).

As proteínas são macromoléculas compostas por aminoácidos, com ligações covalentes entre si e, carregadas eletricamente em função do pH. A eletroforese permite separar as proteínas presentes no plasma em frações, de acordo com suas respectivas cargas elétricas através da migração destas, num meio líquido, sob a influência de um campo elétrico. A migração das proteínas faz-se sobre um suporte sólido poroso (por exemplo, gel de agarose) de forma a que as moléculas carregadas eletricamente se movam em direção ao cátodo ou ânodo, dependendo do tipo de carga que apresentam (a migração dar-se-á na direção do sinal contrário à sua carga). A mobilidade das moléculas é inversamente proporcional ao seu tamanho. As frações obtidas no proteínograma são quantificadas e geram um gráfico

(Figura 32) no qual as bandas podem ser comparadas, permitindo evidenciar anormalidades sugestivas de alguma patologia (Bishop M, 2013).

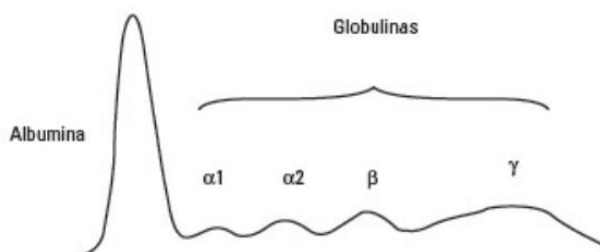


Figura 32: Gráfico normal das bandas obtidas no proteínograma.
Adaptado de: (Bishop M, 2013)

Neste setor, todo este procedimento é realizado recorrendo ao equipamento Capillarys 2 Flex Piercing da sebia (Figura 33), através de soro. Utiliza a eletroforese capilar, ao mesmo tempo que fornece uma separação clara e precisa de proteínas com alto rendimento (sebia, 2015).

A nível de controlos de qualidade, diariamente e, antes do início da rotina diária, os controlos liofilizados são preparados na hora e passados no analisador e, mensalmente são passados controlos externos. Os controlos internos correspondem a duas amostras, uma de nível normal (Normal Control Serum) e outra de nível elevado (Hypergamma Control Serum) por forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento. Os controlos externos, NEQAS, têm por objetivo de monitorizar o desempenho do laboratório, avaliando e verificando se os resultados obtidos estão em conformidade com os obtidos nos restantes laboratórios. Estes são também constituídos por duas amostras, uma do nível normal e outra do nível elevado.

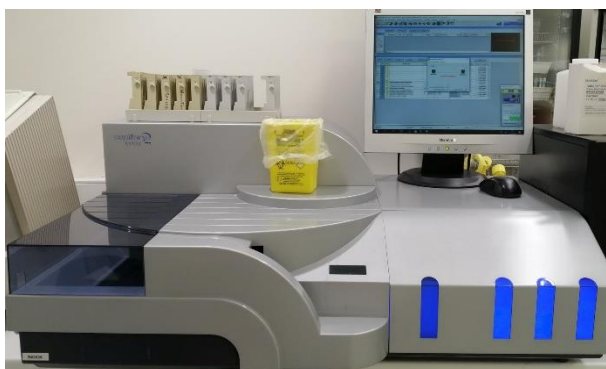


Figura 33: Equipamento dos proteínograma, Capillarys 2 Flex Piercing.
Fotografia de: Inês Mesquita

6.3. Gasimetria

A gasimetria arterial é um teste que pretende avaliar os gases presentes no sangue, através de uma amostra de sangue arterial e, fornece informações sobre a oxigenação, ventilação, balanço ácido/base e equilíbrio eletrólito e metabólico.

As gasimetrias são realizadas recorrendo-se ao analisador RAPIDLab® 348 EX Blood Gas System da Siemens (Figura 34), através de amostras de sangue arterial colhido para seringas com heparina. O equipamento ainda permite realizar o teste do cálcio ionizado, através de amostras de sangue total colhido em tubos sem anticoagulante com gel.



Figura 34: Equipamento de gasimetria arterial, RAPIDLab® 348 EX Blood Gas System. Adaptado de: [\(SIEMENS - RAPIDLab\)](#)

Este analisador garante resultados rápidos (entre 45-90 segundos) e exatos, com o mínimo envolvimento por parte do operador, permitindo o diagnóstico e tratamento de patologias ainda num estado inicial (precoce). Os parâmetros avaliados, incluem o pH, pressão de dióxido de carbono (pCO_2) e pressão de oxigénio (pO_2) (gases no sangue), Na^+ , K^+ , Cl^- , cálcio ionizado (Ca^{2+}) e hematócrito.

O pH, pCO_2 e pO_2 permitem-nos avaliar o equilíbrio ácido/base. O pO_2 ainda permite avaliar a eficácia das trocas de oxigénio. No caso dos eletrólitos, o Na^+ permite avaliar a distribuição de água e pressão osmótica nos tecidos corporais; o K^+ permite avaliar a manutenção neuromuscular (incluindo a função respiratória e do miocárdio); o Cl^- permite a manutenção da neutralidade elétrica e o equilíbrio do sódio; e o Ca^{2+} permite avaliar a função hemostática. Já o hematócrito permite-nos determinar a capacidade de transporte do oxigénio. Adicionalmente o analisador ainda permite a medição dos eletrólitos, pCO_2 e pH em fluidos de diálise renal à base de bicarbonato ou acetato [\(SIEMENS - RAPIDLab\)](#).

A nível de controlos de qualidade, diariamente e, antes do início da rotina diária, são passados controlos internos no analisador, por forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento. Para além dos controlos de qualidade, é essencial garantir a calibração do equipamento, sendo esta realizada automaticamente pelo próprio equipamento.

7. IMUNOLOGIA

Um sistema imunológico saudável é fundamental para a prevenção e/ou combate de doenças infecciosas, bem como para a proteção do organismo contra toxinas, tumores, microrganismos (como bactérias e fungos) ou parasitas. A resposta imunológica é estimulada quando um determinado antígeno estranho no organismo é reconhecido, ativando e mobilizando os componentes necessários para combater o antígeno. As linhas de defesa do organismo, incluem: barreiras físicas (como pele, córnea dos olhos, membranas); linfócitos; moléculas (como anticorpos e proteínas do complemento); e órgãos linfoides. A disfunção do sistema imunológico pode levar a doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus ou tireoidite de Hashimoto ([Rabson A, 2005](#)).

O laboratório de imunologia em junção com o de bioquímica (Figura 28) é coordenado pelo Dr. Miguel Gomes e, desempenha um papel fundamental no estudo do equilíbrio do organismo e de todos os mecanismos de defesa contra qualquer agente externo ou interno que perturbe esse equilíbrio. As duas secções em conjunto são constituídas por: quatro técnicos superiores de saúde e um médico patologista clínico.

O setor recebe diariamente inúmeras amostras, das quais: sangue total colhido em tubos sem anticoagulante com gel (soro), sangue total colhido em tubos com anticoagulante EDTA (realização de BNP) e urina em tubos apropriados (para teste de gravidez ou despiste de drogas). Os soros antes de chegarem ao setor são previamente centrifugadas a 4500 rpm durante 10 minutos.

A rotina diária neste setor inicia-se com a verificação e reposição dos reagentes em falta dos equipamentos, bem como, a passagem de controlos e calibradores pelos mesmos para, aquando da chegada das amostras estar tudo operacional. Antes da chegada das amostras ainda se verifica se os requisitos das amostras processadas nos últimos dois dias estão realizados e descartamos as amostras num recipiente apropriado. Quando as amostras chegam ao setor, confirma-se a matrícula e faz-se o seu processamento de acordo com os requisitos da amostra. No final do dia, há sempre a verificação das listas de trabalho e se existem produtos em falta, bem como o armazenamento das amostras do dia.

Nesta secção, foi-me permitido observar a rotina diária laboratorial e a execução da maioria das tarefas, incluindo: reposição dos reagentes nos equipamentos; preparação e passagem dos controlos e calibradores pelos respetivos equipamentos; separação das amostras de acordo com os requisitos (colocando as amostras nos respetivos equipamentos); armazenamento e eliminação das amostras; análise dos valores dos controlos; e realização de testes imunocromatográficos.

7.1. Determinações imunológicas

O enquadramento global e clínico dos diversos parâmetros imunológicos permitem avaliar e monitorizar inúmeras patologias, como: anemia; metabolismo ósseo; hepatite; tireoide; marcadores tumorais e hormonas. A secção é constituída por dois autoanalísadores, ADVIA Centaur XP Immunoassay System (Figura 35), que determinam a maioria desses parâmetros, através de amostras de soro. Apresenta um rendimento de 240 testes por hora, possui reagentes integrados e operação contínua sem interrupção para maximizar a produtividade (SIEMENS - Centaur XP).



Figura 35: Equipamento de imunologia, ADVIA Centaur XP Immunoassay System.
Adaptado de: (SIEMENS - Centaur XP)

Os parâmetros realizados neste equipamento são baseados em imunoquímica, pelo que, as determinações são baseadas em princípios como:

- **Quimioluminescência direta usando a tecnologia éster de acridina**

A quimioluminescência consiste na produção de luz a partir de uma reação química que, quando combinada com imunoensaios, a luz produzida indica a quantidade de analito na amostra. No caso da quimioluminescência direta, a intensidade da luz produzida é medida diretamente através reações sem a utilização de procedimentos adicionais.

O éster de acridina (EA) é um marcador quimioluminescente usado em imunoensaios que, se liga covalentemente aos anticorpos das partículas paramagnéticas que revestem a área reativa dos tubos onde ocorre a análise, constituindo a fase sólida dos imunoensaios. Posteriormente, o antígeno adicionado ligase à fase sólida. A concentração do analito será então diretamente proporcional à luz emitida pelo marcador quimioluminescente ligado ao analito (Figura 36) (Yao P, 2016).

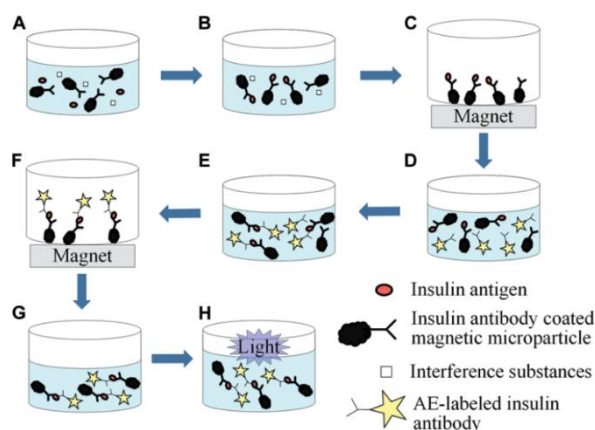


Figura 36: Exemplo de um protocolo para detecção de insulina usando um imunoensaio de quimioluminescência direta e o marcador EA.

A-C: as micropartículas capturam antígenos de insulina; D-F: os antígenos de insulina ligam-se ao anticorpo de insulina marcado com AE; G e H: emitem luz.

Os parâmetros avaliados através deste autoanalisador, incluem ([SIEMENS - Centaur XP](#)):

- **Anemia:**
Ferritina; folato; vitamina B12;
- **Metabolismo Ósseo:**
PTH; vitamina D;
- **Cardíaco:**
BNP; CK-MB; Mioglobina; TnI-Ultra;
- **Hepatite:**
Anti-HBs 2; HBc Total; HBsAgII; HCV;
- **HIV:**
Combinação de HIV;
- **Inflamação:**
IgE total;
- **Metabólico:**
Cortisol;
- **Oncologia:**
CA 125II; CA 19-9; CEA; PSA; PSA livre;
- **Endocrinologia Reprodutiva:**
Estradiol; FSH; LH; Prolactina;
- **ID especial:**
Sífilis;
- **Tireoide:**
Anti-Tg; anti-TPO; T3 livre; T4 livre; T3 total; T4 total; TSH3-Ultra; TSH;

- **Monitorização de drogas terapêuticas:**

Digoxina;

- **ToRCH:**

Rubéola IgG e IgM; toxoplasma IgG e IgM.

Diariamente e, antes do início da rotina diária, é de extrema importância a passagem de controlos de qualidade internos e calibradores pelo analisador, por forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento e, mensalmente de controlos externos. Os controlos internos incluem:

- **ToRCH (controlo negativo):**

Rubéola IgG e IgM; toxoplasma IgG e IgM;

- **ToRCH Plus IgG (controlo positivo):**

Rubéola IgG; toxoplasma IgG;

- **ToRCH Plus IgM (controlo positivo):**

Rubéola IgM; toxoplasma IgM;

- **Cardiac Market Plus:**

BNP; CK-MB; Mioglobina; TnI-Ultra;

- **Tumor Marker Plus:**

CA 125II; CA 19-9;

- **VIROCLEAR (controlo negativo) e VIROTROL (controlo positivo):**

Anti-HBs 2; HBc Total; HBsAgII; HCV; sífilis; HIV;

- **VIROTROL II (controlo positivo):**

Anti-HBs 2;

- **VIROTROL HIV2 (controlo positivo):**

HIV 2;

- **VIROTROL Syphilis (controlo positivo):**

Sífilis;

- **Immunoassay (nível 1 e nível 2):**

PTH; vitamina D;

- **Immunoassay Plus (nível 1, nível 2 e nível 3):**

T3 livre; T4 livre; T3 total; T4 total; TSH; Estradiol; FSH; LH; Prolactina; PSA; PSA livre; IgE total; ferritina; folato; vitamina B12;

- **Anemia (nível baixo):**

Ferritina; folato; vitamina B12.

Os controlos externos, NEQAS, têm por objetivo de monitorizar o desempenho do laboratório, avaliando e verificando se os resultados obtidos estão em conformidade com os

obtidos nos restantes laboratórios. Estes são constituídos por duas alíquotas reconstituídas, uma do nível normal e outra do nível elevado.

Para além dos controlos de qualidade, é essencial garantir que todos os parâmetros estão devidamente calibrados, sendo apenas necessária a calibração quando: o instrumento é instalado inicialmente; os valores dos controlos dão fora do intervalo aceitável; o material de referência sofre alterações de valores ou número de lote. Assim e, de acordo com os parâmetros em causa vamos ter diferentes calibrados, isto é:

- **Calibrador A:**
T₄; T₄ livre; TSH; T₃; T₃livre;
- **Calibrador B:**
FSH; LH; prolactina; TSH;
- **Calibrador C:**
Ferritina; vitamina B12;
- **Calibrador Q:**
PSA;
- **Calibrador 30:**
Estradiol;
- **Calibrador 80:**
IgE total;
- **Calibrador fPSA:**
PSA livre.

7.2. Determinações viricas e hormonais

Por forma a avaliar os parâmetros imunológicos que faltam e a permitem avaliar e monitorizar inúmeras patologias relacionadas com eles - como: infeções viricas e alterações em hormonas relacionadas com a fertilidade – o setor utiliza o autoanalisador IMMULITE 2000 Immunoassay System (Figura 37), através de amostras de soro e de urina. Apresenta um rendimento de 200 testes por hora, possui reagentes integrados e operação contínua sem interrupção para maximizar a produtividade.

As determinações dos diversos parâmetros realizados neste equipamento também são baseadas no princípio da quimioluminescência, contudo necessita de um catalisador enzimático, a fosfatase alcalina (que catalisa a reação de degradação do substrato num produto fluorescente), e um substrato, o dioxetano. A luz emitida, detetada por um fotomultiplicador, é medida, sendo proporcional à quantidade de analito na amostra (SIEMENS - IMMULITE 2000).



Figura 37: Equipamento de imunologia, IMMULITE 2000 Immunoassay System. Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

Os parâmetros determinados por este analisador, incluem:

- **Viricos:**
Citomegalovírus (CMV) IgM e IgG; EBV IgM e IgG; BCG; ECM;
- **Hormonais:**
 β -hCG; androsterona; testosterona.

Diariamente e, antes do início da rotina diária, é de extrema importância a passagem de controlos de qualidade internos e calibradores pelo analisador, por forma a monitorizar a exatidão e precisão do equipamento e, mensalmente de controlos externos. Os controlos internos incluem:

- **VIROCLEAR** (controlo negativo) e **VIROTROL** (controlo positivo):
EBV IgG e IgM; VCG; ECM;
- **Immunoassay Plus** (nível 1 e nível 2):
 β -hCG; androsterona; testosterona;
- **ToRCH** (controlo negativo):
CMV IgG e IgM;
- **ToRCH Plus IgM** (controlo positivo):
CMV IgM;
- **ToRCH Plus IgG** (controlo positivo):
CMV IgG.

Os controlos externos, NEQAS, têm por objetivo de monitorizar o desempenho do laboratório, avaliando e verificando se os resultados obtidos estão em conformidade com os

obtidos nos restantes laboratórios. Estes são constituídos por duas alíquotas reconstituídas, uma do nível normal e outra do nível elevado.

Para além dos controlos de qualidade, é essencial garantir que todos os parâmetros estão devidamente calibrados, sendo apenas necessária a calibração quando: o instrumento é instalado inicialmente; os valores dos controlos dão fora do intervalo aceitável; o material de referência sofre alterações de valores ou número de lote.

7.3. Verificação de resultados

Quando ocorre a formação de um trombo (coágulo sanguíneo) numa veia profunda este, pode acabar por se soltar e entrar na corrente sanguínea, levando à obstrução de vasos mais pequenos, por exemplo nos pulmões, causando embolia pulmonar (EP).

O analisador da BIOMERIEUX, VIDAS® (Figura 38), proporciona testes de rotina ou testes de acesso aleatório para serologia, imunoquímica, deteção de antígeno e homeostase imunológica, permitindo executar até 30 testes em simultâneo (bioMérieux - VIDAS®).



Figura 38: Equipamento de imunologia, VIDAS®.
Fotografia de: [Inês Mesquita](#)

Este analisador permite detetar patologias como trombose venosa profunda (TVP) ou EP através do teste de D-dímeros, bem como, realizar a confirmação de resultados positivos obtidos noutros analisadores, incluindo: HIV; CMV; rubéola e toxoplasma.

Todos os parâmetros realizados no VIDAS são com base no princípio:

- **ELFA (teste imunoenzimático por fluorescência)**

Baseia-se num ensaio imunoenzimático que, associa o método de sanduíche com a deteção por fluorescência. Primeiramente, dá-se a reação Ag-Ac, anticorpo este marcado com a enzima fosfatase alcalina que, quando reagem com um substrato produz fluorescência. A emissão de fluorescência é então proporcional a quantidade de antígeno presente na amostra.

A nível de controlos de qualidade e calibradores, estes não precisam ser passados diariamente devido à elevada estabilidade do analisador (McPherson R, 2017).

7.4. Testes imunocromatográficos

O despiste de drogas através da urina é dos métodos mais comuns para verificar se o utente usa drogas ilegais ou toma uma dose de medicamentos superior à prescrita pelo médico.

O despiste de drogas é realizado recorrendo a testes rápidos (testes imunocromatográficos). Na Figura 39 está representado um exemplar dos testes usados, em que se obtém o resultado em 5 min. Neste setor os testes usados e as drogas testadas são:

- **Drug-Screen THC 25 Test**
Teste para a deteção de canábis.
- **Drug-Screen MOF/OPI 100 Test**
Teste para a deteção de morfina e opiáceos.
- **Drug-Screen COC 100 Test**
Teste para a deteção de cocaína.
- **Drug-Screen MET 100 Test**
Teste para a deteção de metanfetamina.
- **Drug-Screen BZD 100 Test**
Teste para a deteção de benzodiazepina.



Figura 39: Exemplar de um teste usado para deteção de drogas na urina, Drug-Screen BZD 100 Test.

8. CONCLUSÃO

O período de estágio no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Hilário de Lima - Unilabs proporcionou-me um aprofundamento de conhecimentos práticos e teóricos. Permitiu-me ainda crescer a nível profissional e pessoal, para além de me ter dado a oportunidade de integrar a rotina laboratorial.

A passagem pelas diversas áreas (microbiologia, hematologia, imunologia e bioquímica) proporcionaram-me uma experiência de grande valor, tanto teórico como prático. Sendo-me possível, como componente prática, utilizar vários analisadores, com fundamentos e metodologias diferentes, que até então não tinha tido qualquer contacto. Tal como referi ao longo do relatório, aprendi a realizar calibrações e controlos de qualidade que representam uma parte fundamental na determinação de análises válidas para qualquer tipo de parâmetro, seja em que área for.

Quanto à validação de resultados, fui acompanhando e percebendo nas diversas áreas, quando é que se podia validar ou não os resultados, o que foi extremamente interessante e, permitiu-me exprimir conhecimentos que adquiri ao longo do meu percurso académico.

Após este estágio e mais uma etapa concluída, compreendo a importância de todas as disciplinas que integram o plano de estudo do mestrado em análises clínicas, sendo que todas desempenham um papel fundamental na rotina diária de um laboratório.

Assim e, para finalizar, só me resta destacar a enorme oportunidade que me foi dada por todos os membros do laboratório, que me permitiram ganhar experiência e autonomia no laboratório e, o privilégio que me foi dado por ter realizado o estágio no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Hilário de Lima.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.Menarini Diagnostics. HB9210 PREMIER - Manual do utilizador.

Ahmed N. Fundamentals of Biomedical Science - Clinical Biochemistry. 2 ed: Oxford; 2017.

Azevedo M. Hematologia Básica: Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial. 6 ed: Thieme Revinter; 2019.

BECKMAN COULTER - iRICELL. iRICELL Series Urinalysis Workcell. [<https://www.beckmancoulter.com/products/urinalysis/iricell> (28/03/2020)].

BIO-RAD: Card-ID ABO/D. DiaClon ABO/D. [<https://www.bio-rad.com/en-pt/product/diaclon-abo-d?ID=LO32WTIVK> (04/04/2020)].

BIO-RAD: Card-ID LISS/Coombs. LISS/Coombs + Enzyme Test. [<https://www.bio-rad.com/en-pt/product/liss-coombs-enzyme-test?ID=LO2QYDIDF> (04/04/2020)].

BIO-RAD: OptiMAL-IT. Individual Test for Rapid Malaria Diagnostics of *P. falciparum* et non *P. falciparum* infection in human whole blood. 2015:1-10.

bioMérieux - VIDAS®. VIDAS® - Sistema de imunoensaio multiparamétrico para um volume médio. [<https://www.biomerieuxpt/produto/vidasr> (30/03/2020)].

bioMérieux® - CLED. CLED meio - Isolamento de microrganismos urinários. [<http://www.biomerieux.com> (27/03/2020)].

bioMérieux® - Neiss. Micro Neisseria Medium (VCTA) - Selective isolation and cultivation of Neisseria species. [<http://www.biomerieux.com> (27/03/2020)].

bioMérieux® - SS. Salmonella Shigella Agar - Selective isolation of Salmonella and Shigella. [<http://www.biomerieux.com> (27/03/2020)].

bioMérieux® - TODD. Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T) - Caldo de enriquecimento selectivo para os estreptococos do grupo B. [<http://www.biomerieux.com> (27/03/2020)].

Bishop M, Fody E, Schoeff L. Clinical Chemistry - Principles, Techniques, Correlations (Chapter 11: AminoAcids and Proteins). 7 ed: Wolters Kluwer; 2013. 235-42 p.

DGS, (Direção Geral da Saúde). Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. 2004.

DIESSE. VES-MATIC CUBE 80.

[<https://www.diesse.it/en/Instruments/id:45/Ves-Matic-CUBE-80> (04/04/2020)].

Farrell P, White T, Ren C, Hempstead S, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley S, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern K, Marshall B, Sosnay P. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *The Journal of Pediatrics*. 2017;181:S4-S15.

Flores-Mireles A, Walker J, Caparon M, Hultgren S. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature*. 2015;13:269-84.

Hall A, Yates C. *Immunology (Fundamentals of Biomedical Science)*. 1 ed: OXFORD; 2010.

Hoffbrand V, Moss H. *Fundamentos de Hematologia*. 6 ed: artmed; 2013.

Holanda C, Arimateia D, Neto R. *Manual de Bacteriologia e de Enteroparasitos*: edufnrn; 2017.

Levinson W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 13 ed: AMGH; 2016.

McPherson R, Pincus M. *Henry's: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 23 ed: ELSEVIER; 2017.

Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical Microbiology*. 6 ed: Mosby; 2008.

Ochei J, Kolhatkar A. *Medical Laboratory Science. Theory and Practice*. 2 ed: Tata Mcgraw-Hill Publishing Company Limited; 2000. 73-6 p.

Rabson A, Roitt I, Delves P. *Really Essential Medical Immunology*. 2 ed: Blackwell; 2005.

sebia. CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING: The reference in routine capillary electrophoresis for medical laboratories.

[<https://www.sebiacom/en-EN/produits/capillarys-2-flex-piercing> (26/03/2020)]. 2015.

SIEMENS - ADVIA 1800. ADVIA 1800 Chemistry System: Pushing the limit of productivity. [<https://www.siemens-healthineers.com/clinical-chemistry/systems/advia-1800-chemistry-system> (20/03/2020)].

SIEMENS - Centaur XP. ADVIA Centaur XP Immunoassay System: How does your lab meet varied testing demands?

[<https://www.siemens-healthineers.com/immunoassay/systems/advia-centaur-xp>
(28/03/2020)].

SIEMENS - CS 2500. Sysmex CS-2500 System: Excel with confidence in your hemostasis testing.

[<https://www.siemens-healthineers.com/hemostasis/systems/sysmex-cs-2500-system>
(04/04/2020)].

SIEMENS - IMMULITE 2000. IMMULITE 2000 Immunoassay System: Advanced Immunoassay System.

[<https://www.siemens-healthineers.com/pt/immunoassay/systems/immulite-2000-immunoassay-system> (29/03/2020)].

SIEMENS - RAPIDLab. RAPIDLab® 348EX Blood Gas System - Deliver reliable and economical critical care testing in low-volume settings.

[<https://www.siemens-healthineers.com/blood-gas/blood-gas-systems/rapid-lab-348-ex>
(28/03/2020)].

SYSMEX - FFC. Citometria de Fluxo com Fluorescência.

[<https://www.sysmexes/es-pt/academia/knowledge-centre/tecnologia/citometria-de-fluxo-com-fluorescenciahtml> (04/04/2020)].

SYSMEX - SEED Hematologia. Melhoramento e Desenvolvimento Educacional da Sysmex. SEED Hematologia. 2012;4:1-8.

SYSMEX - SLS. Método de deteção SLS.

[<https://www.sysmexes/es-pt/academia/knowledge-centre/tecnologia/metodo-de-detecao-slshtml> (04/04/2020)].

SYSMEX - XN 1000. Tecnologia e Parâmetros Clínicos Avançados - Analisadores Hematológicos Automatizados Série XN. 2012:1-8.

WHO. World Health Organization laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5 ed: WHO; 2010.

Yao P, Liu Z, Tung S, Dong Z, Liu L. Fully Automated Quantification of Insulin Concentration Using a Microfluidic-Based Chemiluminescence Immunoassay. Journal of Laboratory Automation. 2016;21(3):387-93.