

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Fisiopatologia da anemia associada à COVID-19

Raquel Oliveira Machado

M
2022



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

Fisiopatologia da anemia associada à COVID-19

Trabalho realizado sob a orientação dos Professores:

Dra. Alice Santos Silva

Dra. Susana Coimbra

Raquel Oliveira Machado

Julho de 2022

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

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às professoras Dra. Alice Santos Silva e Dra. Susana Coimbra pela orientação e pelo apoio e motivação oferecidos durante todo o processo de desenvolvimento desta monografia.

Agradeço também ao restante corpo docente e colegas do mestrado pelo suporte que me ofereceram durante o meu tempo no curso.

Por fim, agradeço à minha família e amigos por me acompanharem e apoiarem nesta etapa tão importante.

Fisiopatologia da anemia associada à COVID-19

Resumo

O SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) é responsável pela doença COVID-19, declarada como uma doença pandêmica pela Organização Mundial de Saúde a 11 de março de 2020. A apresentação clínica da COVID-19 pode apresentar três fases, embora apenas cerca de 20% dos doentes infetados progrida até à fase 3 da doença. Nesta fase, o SARS-CoV-2 atinge as unidades de troca gasosa do pulmão, e a lesão persistente causada pela “tempestade” de citocinas desencadeada pela infeção, pode determinar síndrome de desconforto respiratório agudo, a principal causa de morte na COVID-19.

Os testes de diagnóstico usados para detetar a infeção ativa por SARS-CoV-2 incluem o teste RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) e testes de antigénio. Para estratificação de risco e acompanhamento da evolução clínica dos doentes, é importante a realização de estudos analíticos, bioquímicos e hematológicos.

O metabolismo do ferro, em estrita dependência da resposta inflamatória, quando afetado pode contribuir para o desenvolvimento de anemia. Existem evidências de alteração do metabolismo do ferro em doentes COVID-19, que induzem uma deficiência funcional em ferro, resultante do processo inflamatório exacerbado. As alterações no metabolismo do ferro podem também ter impacto na eritropoiese.

A anemia da inflamação representa uma comorbilidade relativamente comum em doentes COVID-19. Diversos estudos estabeleceram uma correlação da gravidade da anemia e da concentração de hemoglobina com a evolução clínica e gravidade da COVID-19; verificou-se também, uma associação significativa com o tempo de hospitalização, risco de admissão em Unidades de Cuidados Intensivos e mortalidade. Assim, tem sido proposto que os parâmetros que definem a anemia sejam incluídos em algoritmos para avaliação de risco de evolução grave e de mortalidade em doentes COVID-19.

Esta monografia tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre as alterações desencadeadas pelo vírus SARS-CoV-2 no hemograma dos doentes, focando o impacto desta infeção no desenvolvimento de anemia ou no agravamento de anemia pré-existente.

Palavras-chave: COVID-19; Anemia da inflamação; Metabolismo do ferro.

Pathophysiology of anemia associated with COVID-19

Abstract

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) is the virus responsible for COVID-19, declared as a pandemic disease by the World Health Organization on March 11, 2020. The clinical presentation of COVID-19 can have three phases, although only about 20% of the infected patients progress to stage 3 of the disease. At this stage, SARS-CoV-2 reaches the gas exchange units of the lung, and the persistent injury caused by the cytokine storm triggered by the infection, can determine acute respiratory distress syndrome, the main cause of death in COVID-19.

Diagnostic tests used to detect active SARS-CoV-2 infection include the RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) test and antigen tests. For risk stratification and monitoring of the clinical course of patients, it is important to carry out biochemical and hematological studies.

Iron metabolism is strictly dependent on the inflammatory response, and when affected can contribute to the development of anemia. There is evidence of altered iron metabolism in COVID-19 patients, which induce a functional iron deficiency resulting from the exacerbated inflammatory process. Changes in iron metabolism may also impact erythropoiesis.

Anemia of inflammation represents a relatively common comorbidity in COVID-19 patients. Several studies have established a correlation of anemia severity and hemoglobin concentration with the clinical course and severity of COVID-19; there was also a significant association with length of hospital stay, risk of Intensive Care Unit admission and mortality. Thus, it has been proposed that the parameters that define anemia be included in algorithms for risk assessment of severe disease evolution and mortality in COVID-19 patients.

The aim of this study is to carry out a literature review on the changes triggered by SARS-CoV-2 in the patients' blood count, focusing on the impact of this infection on the development of anemia or on the worsening of pre-existing anemia.

Keywords: COVID-19; Anemia of inflammation; Iron metabolism.

Índice

Monografia

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	ix
Lista de abreviaturas e símbolos	x
1 Introdução.....	1
2 SARS-CoV-2	2
3 COVID-19	2
3.1 Patogénese	2
3.2 Manifestações clínicas.....	5
3.3 Diagnóstico.....	5
3.4 Marcadores analíticos.....	6
4 Fisiopatologia da anemia associada à COVID-19	9
4.1 Metabolismo do ferro	9
4.1.1 Regulação do metabolismo do ferro	11
4.1.2 Deficiência em ferro	13
4.2 Anemia na COVID-19	14
4.2.1 Inflamação e metabolismo do ferro	14
4.2.2 Expressão de TLR9 e eritrofagocitose.....	17
4.2.3 Hemólise e alterações morfológicas dos eritrócitos.....	17
5 Prevalência da anemia.....	18
5.1 Classificação etiológica da anemia	21
6 Valor prognóstico da anemia.....	21
6.1 Valor prognóstico da gravidade da anemia.....	24

6.2	Valor prognóstico da concentração de Hb	24
7	Possíveis terapêuticas adjuvantes	27
7.1	Imunossupressão	27
7.2	Suplementação de ferro	28
7.3	Quelantes de ferro.....	28
7.4	Agentes estimuladores da eritropoiese.....	29
7.5	Transfusões de sangue	30
8	Conclusão.....	31
9	Referências bibliográficas.....	32

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição de casos totais de COVID-19 pelas regiões da Organização Mundial de Saúde (OMS). Dados recolhidos de WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (2).	1
Figura 2. Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2. Adaptado de Florindo et al. (6).	2
Figura 3. Representação esquemática da patogénese da infeção por SARS-CoV-2.....	3
Figura 4. Alterações laboratoriais observadas em doentes COVID-19 com significância clínica para a avaliação da gravidade e monitorização da doença.....	7
Figura 5. Esquema da absorção do ferro pelas células endoteliais duodenais e mobilização do ferro para outras células do corpo.	10
Figura 6. Esquema das vias e fatores que regulam síntese de hepcidina e ação da hepcidina no metabolismo do ferro.	12
Figura 7. Fisiopatologia da anemia da inflamação.....	14
Figura 8. Possível fisiopatologia da anemia da inflamação associada à COVID-19 e de outras complicações associadas à infeção por SARS-CoV-2 e alterações do metabolismo do Ferro.	15

Índice de tabelas

Tabela 1. Diagnóstico diferencial da deficiência absoluta em ferro e da deficiência funcional em ferro.....	13
Tabela 2. Percentagem e número (n) de doentes COVID-19 com anemia na admissão hospitalar e respetiva gravidade, reportados em diversos estudos.	19
Tabela 3. Comparação dos níveis de Hb entre doentes COVID-19, doentes não COVID e pessoas saudáveis.....	20
Tabela 4. Associação da anemia em doentes COVID-19 e respetivo valor preditivo em relação à duração de hospitalização, admissão na UCI e mortalidade.....	22
Tabela 5. Níveis de hemoglobina (Hb) em doentes COVID-19 graves e doentes não graves (de acordo com a classificação OMS).	25
Tabela 6. Associação dos níveis de hemoglobina (Hb) com a mortalidade da doença COVID-19.	26

Lista de abreviaturas e símbolos

ACE2	<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i>
ALK3	<i>Activin Receptor-like Kinase 3</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BMP6	<i>Bone Morphogenetic Protein 6</i>
BMPR1	Recetor BMP tipo 1
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
citB	Citocromo B
CK	Creatina Cinase
CTFF	Capacidade Total de Fixação do Ferro
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C Chemokine Receptor</i>
DMT1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>
EPO	Eritropoietina
FPN1	Ferroportina 1
Hb	Hemoglobina
HCP1	<i>Heme Carrier Protein 1</i>
HEPH	<i>Hephaestin</i>
HFE	<i>Human Hemochromatosis Protein</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factors</i>

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HJV	<i>Hemojuvelin</i>
HO1	<i>Heme Oxygenase 1</i>
HRE	<i>Hypoxia Responsive Elements</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
JAK2-STAT3	<i>Janus Kinase2 - Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins3</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome CoV</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha</i>
mtDNA	DNA Mitochondrial
N/L	Índice Neutrófilos/Linfócitos
NF-kB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NT-proBNP	Porção N-terminal do Péptido Natriurético tipo B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PaO ₂	Pressão Parcial de Oxigénio no Sangue Arterial
PCR	Proteína C-reativa
PHD	<i>Prolyl Hydroxylases Domain</i>
RBC	<i>Red Blood Cells</i>
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>

rhEPO	Eritropoietina Humana Recombinante
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
SaO ₂	Saturação Arterial de Oxigênio
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SDRA	Síndrome de Desconforto Respiratório Agudo
SRE	Sistema Reticuloendotelial
TAAN	Teste Moleculares de Amplificação de Ácidos Nucleicos
TfR	Recetor de Transferrina
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP	Tempo de Protrombina
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
VS	Velocidade de Sedimentação

1 Introdução

Esta monografia tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre as alterações desencadeadas pelo vírus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) no hemograma dos doentes, focando o impacto desta infeção no desenvolvimento de anemia ou no agravamento de anemia pré-existente.

O vírus SARS-CoV-2 é responsável pela doença COVID-19, relatada pela primeira vez no final de dezembro de 2019 em Wuhan, China. Devido à sua elevada contagiosidade, o vírus propagou-se rapidamente, tornando-se numa ameaça mundial em apenas alguns meses. A 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como uma doença pandémica, tornando-se a quinta pandemia mundial após a gripe de 1918 (1). A 19 de maio de 2022, mais de dois anos após o início da pandemia, foram registados mundialmente mais de 500 milhões de casos e mais de 6 milhões de mortes. Das regiões OMS, a que acumula mais casos de COVID-19 é a Europa com 218.995.871 casos, seguida das Américas com 155.357.749 casos (Figura 1) (2).

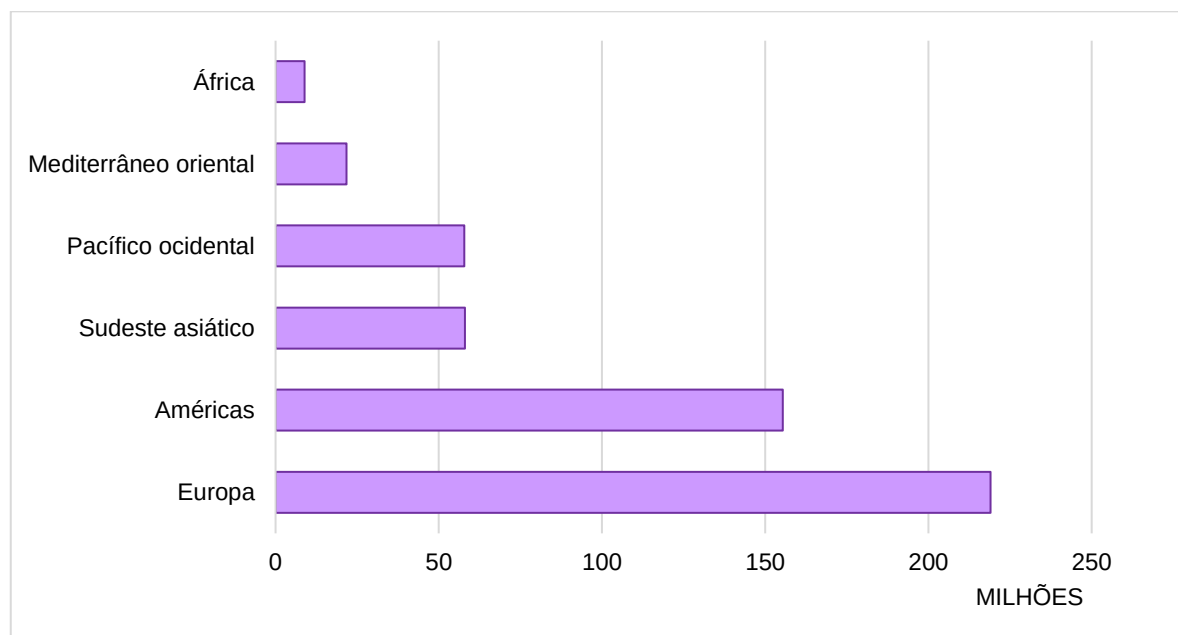


Figura 1. Distribuição de casos totais de COVID-19 pelas regiões da Organização Mundial de Saúde (OMS). Dados recolhidos de WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (2).

2 SARS-CoV-2

Os coronavírus são vírus de RNA de cadeia única e pertencem à subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*. Antes da pandemia por SARS-CoV-2 estavam identificados 6 coronavírus, dois dos quais causaram epidemias de grande escala, o SARS-CoV em 2002 e o MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome CoV*) em 2012 (3). O SARS-CoV-2 faz parte dos β -coronavírus e o estudo do seu genoma mostrou que compartilha 80% da sequência genética com o primeiro vírus SARS-CoV e 96% com o coronavírus identificado em morcegos (4, 5).

As principais proteínas estruturais do SARS-Cov-2 são a glicoproteína de superfície “spike” (S), a proteína do envelope (E), a proteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (Figura 2). Destas quatro proteínas, a proteína S desempenha um papel fundamental na ligação a recetores da membrana da célula alvo, como a ACE2 (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*), que funciona como um recetor para os coronavírus SARS-CoV e SARS-CoV-2 (1).

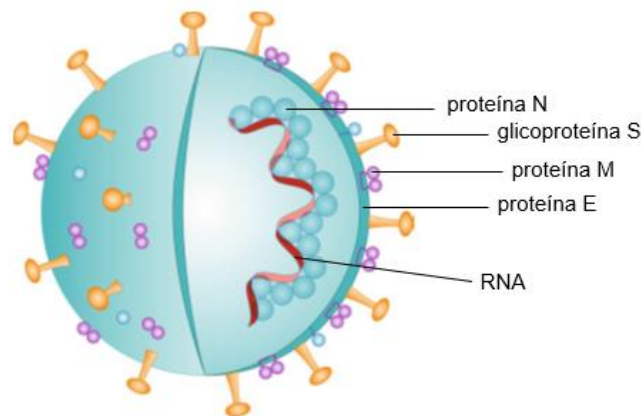


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2. Adaptado de Florindo *et al.* (6).

É um vírus de RNA de cadeia única composto por quatro proteínas estruturais principais: glicoproteína de superfície “spike” (S); proteína do envelope (E); proteína da matriz (M) e proteína do nucleocapsídeo (N).

3 COVID-19

3.1 Patogénese

A apresentação clínica da COVID-19 pode ser dividida em três fases, que correspondem a diferentes estádios clínicos da doença (Figura 3).

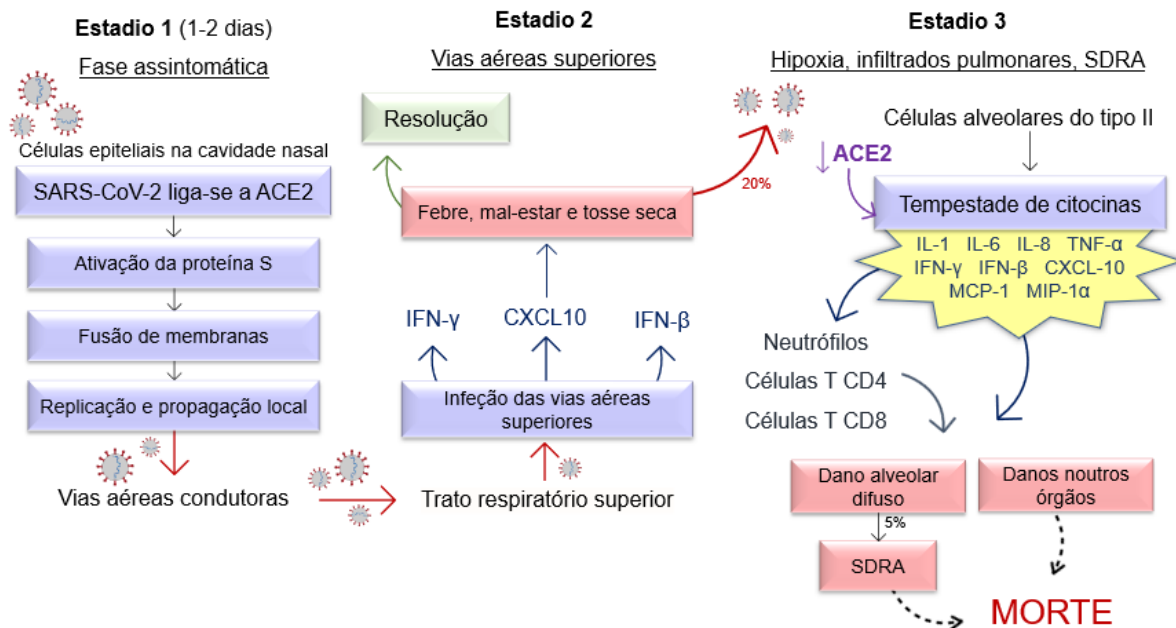


Figura 3. Representação esquemática da patogênese da infecção por SARS-CoV-2.

ACE2 – Angiotensin-Converting Enzyme 2; CXCL – C-X-C Motif Chemokine Ligand; IFN – interferon; IL – interleucina; MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein-1; MIP-1α – Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha; SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; SDRA – Síndrome de Desconforto Respiratório Agudo; TNF – Tumor Necrosis Factor.

Estadio 1: fase assintomática (1-2 dias iniciais de infecção)

O SARS-CoV-2 é transmitido através de gotículas respiratórias e aerossóis, de pessoa para pessoa (7). Liga-se primeiramente às células epiteliais na cavidade nasal, que expressam ACE2 (7, 8). Após a ligação do vírus ao recetor ACE2, a proteína S é ativada através de uma clivagem por proteases. A ativação da proteína S causa alterações conformacionais que levam à fusão da membrana viral com a da célula hospedeira (7, 9).

Nesta fase, o SARS-CoV-2 liga-se às células epiteliais na cavidade nasal, que expressam ACE2 (7, 8). Após a fusão de membranas, o vírus entra nas células epiteliais, o conteúdo viral é libertado no interior, onde sofre replicação (7). A esta replicação segue-se a propagação local, com infecção de outras células ciliadas nas vias aéreas condutoras (7, 8).

A resposta imune inata nesta fase é limitada. Apesar de os doentes apresentarem uma carga viral baixa, são altamente infecciosos, podendo o SARS-CoV-2 ser já detetado no trato respiratório superior, através de testes adequados (7, 8).

Estadio 2: fase de envolvimento das vias aéreas superiores

O SARS-CoV-2 propaga-se, migrando pelo trato respiratório superior ao longo das vias aéreas condutoras. A infecção das vias aéreas superiores desencadeia uma resposta imune inata mais robusta, com desenvolvimento de sintomas, que incluem febre, mal-estar e tosse seca (7, 8).

Nesta fase, há libertação da quimiocina CXCL10 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand* 10) e de interferons (IFN) pelas células infetadas pelo vírus (7, 8).

A maioria dos doentes não progride além desta fase, visto que a resposta imune é suficiente para conter a propagação da infecção (7). Cerca de 20% dos doentes infetados progridem para o estadio 3 da doença (8, 10).

Estadio 3: fase de hipoxia, infiltração pulmonar e progressão para SDRA

Nesta fase, o SARS-CoV-2 atinge as unidades de troca gasosa do pulmão, onde a ACE2 é altamente expressa, infetando as células alveolares do tipo II ou pneumócitos do tipo II (7, 8). Vários fatores têm sido associados à inflamação agressiva causada pelo SARS-CoV-2, incluindo a replicação viral rápida, lesão celular e regulação negativa de ACE2, com a diminuição da expressão do recetor (9).

Os pneumócitos do tipo II infetados libertam diversas interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-120 e IL-12) e citocinas, como o TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*), IFN- γ e IFN- β , CXCL-10, MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) e MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha*). Esta “tempestade” de citocinas promove a mobilização de diferentes células inflamatórias, neutrófilos, células T auxiliares CD4 e células T citotóxicas CD8 (7, 9).

A ACE2 é regulada negativamente quando o SARS-CoV-2 entra nas células hospedeiras (9, 11). A ACE2 é uma proteína importante na regulação do sistema renina-angiotensina, que converte a angiotensina II em angiotensina 1-7. A angiotensina II ativa diretamente a resposta pró-inflamatória e a libertação de citocinas, enquanto a angiotensina 1-7 é responsável pela resposta anti-inflamatória e, assim, atua na prevenção de lesão do tecido pulmonar. Assim, a regulação negativa da ACE2, causada pela infecção SARS-CoV-2, está associada ao aumento da resposta pró-inflamatória e a danos em vários órgãos (9, 11).

A causa direta de morte por COVID-19 envolve danos causados pela “tempestade” de citocinas nos pulmões, mas também noutros órgãos, como o coração, rim e fígado (12). Na doença grave, as células hospedeiras sofrem apoptose após a libertação de novas partículas virais, que podem infetar outras células alveolares do tipo II adjacentes. A lesão

persistente, causada pelas células inflamatórias sequestradas e pela replicação viral, determina lesões alveolares difusas, que eventualmente culmina na síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA), a principal causa de morte na COVID-19 (7, 8, 12).

3.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da COVID-19 variam de doença assintomática a doença muito grave. A maioria dos casos sintomáticos apresentam-se como uma doença ligeira (40%), cuja sintomatologia inclui febre, tosse, fadiga, anorexia, dispneia, mialgias e, ainda, sintomas inespecíficos, como dor de garganta, cefaleias e perda de olfato e/ou paladar. A doença moderada (40%), para além dos sintomas referidos para a doença ligeira, associa sinais clínicos de pneumonia. Aproximadamente 15% dos doentes desenvolve doença grave (pneumonia grave) e 5% desenvolve complicações associadas a doença crítica, tais como insuficiência respiratória e SDRA (10).

3.3 Diagnóstico

Os testes de diagnóstico usados para detetar a infeção ativa por SARS-CoV-2 incluem testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN) e testes de antigénio. Estes testes podem também ser usados como testes de triagem, para reduzir a transmissão do vírus, permitindo o isolamento atempado de pessoas infetadas (13).

Os testes de antigénio são imunoensaio que detetam a presença de um antigénio viral específico. Estes testes têm uma especificidade semelhante à dos TAANs, mas são menos sensíveis do que a maioria destes (13). Por outro lado, estes testes são mais baratos que os TAANs e podem fornecer resultados em poucos minutos, tornando-os muito úteis em programas de triagem. Existem testes de antigénio disponíveis para serem realizados em casa (autotestes), em postos de atendimento ou em laboratórios de análises clínicas. Devido às características de desempenho dos testes de antigénio, é recomendada a confirmação dos resultados através de um TAAN, em laboratório de análises clínicas (13).

Os TAANs, como o teste RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*), são os métodos de referência para o diagnóstico definitivo da infeção por SARS-CoV-2 (13). São testes de alta sensibilidade e especificidade para diagnosticar a infeção por SARS-CoV-2. Estes testes detetam um ou mais genes de RNA viral e, na maioria, apresentam-se resultados qualitativos. Para a realização destes TAANs podem usar-se diferentes tipos de amostras do trato respiratório superior, como exsudado da nasofaringe e da orofaringe e saliva (13).

Para além dos TAANs e dos testes de antigénio, existem testes de anticorpos ou testes serológicos que são usados para detetar infeção prévia por SARS-CoV-2 e podem auxiliar no diagnóstico de síndrome inflamatória multi-sistémica (13). Estes testes de imunodiagnóstico permitem a deteção de anticorpos desenvolvidos em resposta à infeção viral, do tipo IgG (Imunoglobulina G) e IgM. O anticorpo específico do tipo IgM pode ser detetado num doente após 3 a 6 dias de infeção; o anticorpo específico do tipo IgG pode detetar-se nos estágios posteriores da infeção (14). O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) não recomenda o uso de testes de anticorpos para diagnosticar uma infeção em curso (13). Dependendo do momento em que o indivíduo foi infetado e em que se realizou o teste, os anticorpos podem não ser detetados, apesar da infeção estar instalada. Os testes de anticorpos são recomendados para vigilância da saúde pública e para fins epidemiológicos (13).

Para estratificação de risco e acompanhamento da evolução clínica dos doentes, é importante a realização de estudos analíticos, bioquímicos e hematológicos; pode também ser importante a realização de exames complementares, como exames radiológicos ou outros.

3.4 Marcadores analíticos

A produção descontrolada de citocinas pode levar a danos teciduais em diversos órgãos, para além dos pulmões (9). A disfunção que pode observar-se em múltiplos órgãos nos doentes COVID-19 pode ser atribuída à ampla distribuição dos recetores ACE2 em tecidos extrapulmonares, incluindo coração, rim, endotélio e intestino (11).

As formas moderadas e graves da COVID-19 são frequentemente acompanhadas de alterações bioquímicas, imunológicas, hemostáticas e de alterações hematológicas que refletem a disfunção de órgãos e sistemas (Figura 4) (15-17). Estas alterações podem, por isso, ser usadas para a avaliação da gravidade da doença e a sua monitorização.

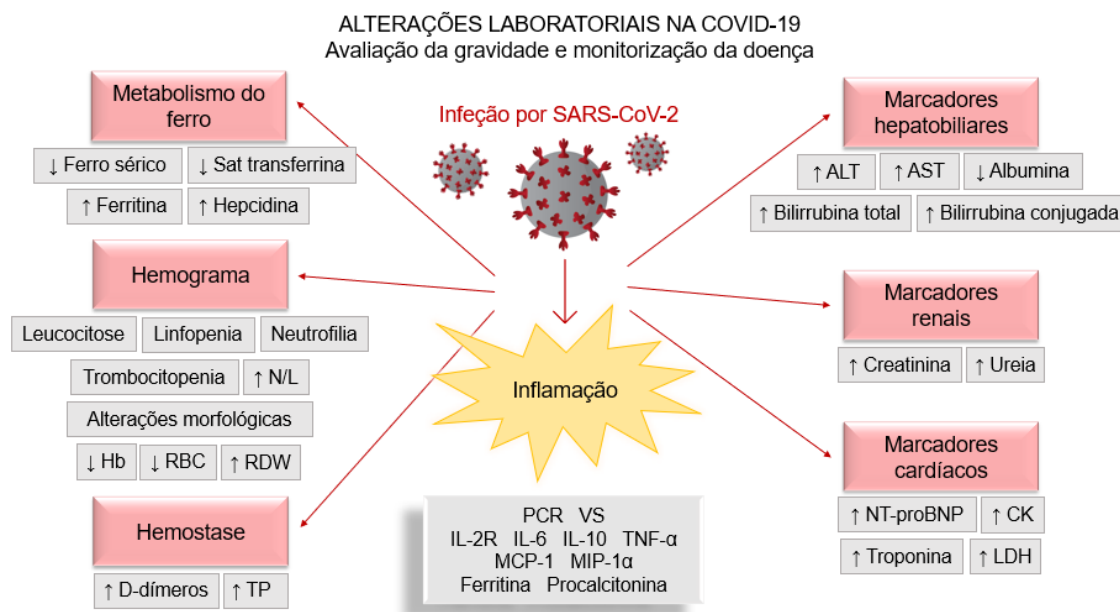


Figura 4. Alterações laboratoriais observadas em doentes COVID-19 com significância clínica para a avaliação da gravidade e monitorização da doença.

ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase; CK – Creatina Cinase; Hb – Hemoglobina; IL – Interleucina; LDH – Lactato Desidrogenase; MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*; MIP-1 α – *Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha*; N/L – Índice Neutrófilos/Linfócitos; NT-proBNP – Porção N-Terminal do Péptido Natriurético tipo B; PCR – Proteína C-reativa; RBC – *Red Blood Cells*; RDW – *Red Cell Distribution Width*; sat – saturação; TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha*; TP – Tempo de Protrombina; VS – Velocidade de Sedimentação.

Do estudo hemostático e bioquímico, para avaliação e monitorização da doença, destacam-se como mais relevantes os marcadores da hemostase (D-dímeros, tempo de protrombina), marcadores cardíacos [porção N-terminal do péptido natriurético tipo B, lactato desidrogenase, creatina cinase, troponina I (de alta sensibilidade, hs-TnI), marcadores hepatobiliares [alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, bilirrubina total, bilirrubina conjugada e albumina] e marcadores renais (creatinina e ureia) (16, 18-20).

Os marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa (PCR), a velocidade de sedimentação (VS), algumas citocinas (IL-2R, IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1 e MIP-1 α), a ferritina e a procalcitonina têm sido determinados em doentes COVID-19 e correlacionados com a gravidade da doença (16, 18-20). Biomarcadores do metabolismo do ferro, como o ferro sérico, a saturação da transferrina, a ferritina e a hepcidina, estão em estrita dependência da resposta inflamatória, o que pode refletir-se em alterações nos valores do hemograma (18, 21-24).

No leucograma, os achados mais proeminentes na infecção por SARS-CoV-2 são leucocitose, acompanhada de neutrofilia e linfopenia (18, 20-22, 25). Embora a leucocitose seja um achado comum, pode observar-se leucopenia em alguns doentes (26, 27).

Eventualmente, pode também ser observada uma diminuição no valor (n/L) de eosinófilos e aumento do valor de monócitos (25, 27-29). A análise dos subtipos de linfócitos em indivíduos com COVID-19 mostra que os linfócitos T são as células mais afetadas pelo SARS-CoV-2, sendo a sua concentração quase metade do valor inferior de referência (28).

A razão entre os valores (n/L) de neutrófilos e de linfócitos – índice N/L – que reflete o equilíbrio entre inflamação aguda e crônica (neutrófilos/L) e imunidade adaptativa (linfócitos/L), está elevado nos doentes infetados com SARS-CoV-2, resultante da neutrofilia e linfopenia característica da doença (21, 28, 30).

Para além das alterações quantitativas, podem observar-se também algumas alterações na morfologia dos leucócitos, nestes doentes. O estudo dos neutrófilos evidenciou um tamanho significativamente menor, com vacúolos citoplasmáticos de pequena dimensão e granulação tóxica (31-34). Foram também referidas alterações nucleares, com aumento do número de neutrófilos em banda, e também células dismórficas com total ausência de segmentação nuclear (morfologia *pseudo-Pelger*) (31, 32, 34). Granulócitos imaturos, especialmente mielócitos e metamielócitos pequenos, estão frequentemente presentes na fase inicial da doença (32, 34, 35).

Os linfócitos apresentam maiores dimensões, podendo observar-se linfócitos granulares grandes, linfócitos atípicos e linfócitos com vacúolos citoplasmáticos de pequenas dimensões (31-33). O número de linfócitos reativos, e em particular, de células linfoplasmocitóides aumentam significativamente na COVID-19 (32, 33, 35). Também os monócitos reativos aumentam significativamente em doentes infetados por SARS-CoV-2. Além disso, há um aumento significativo da granularidade dos monócitos (33). Os monócitos apresentam numerosos vacúolos, de grandes dimensões (31, 32).

A trombocitopenia é um achado comum nos indivíduos infetados com SARS-CoV-2, acompanhada frequentemente da presença de plaquetas gigantes (18, 21, 22, 34-37).

No eritrograma observaram-se algumas alterações quantitativas e qualitativas, na infeção por SARS-CoV-2. A concentração da hemoglobina (Hb) diminui, tendo sido atribuído valor prognóstico ao valor dessa redução (21, 22, 27, 37, 38). Na contagem de eritrócitos e no valor do hematócrito observa-se uma diminuição (15, 38). Os índices hematimétricos, hemoglobina globular média, volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média, podem sofrer também uma diminuição. O RDW (*Red Cell Distribution Width*) é, no entanto, o índice hematimétrico que apresenta alterações mais significativas, aumentando o seu valor na infeção por SARS-CoV-2 (21, 36, 38).

Os eritrócitos de doentes COVID-19 podem apresentar alterações morfológicas, como anisocitose, de acordo com o aumento do RDW (39-41). Presença de esquistócitos, esferócitos, estomatócitos e eritrócitos em forma de cogumelo pode também ocorrer nestes

doentes (36, 39-43). Para além do desvio à esquerda na linha mieloide, há também relatos de eritroblastose, evidenciada pela presença de células eritroblásticas (32, 35, 36, 42, 44).

4 Fisiopatologia da anemia associada à COVID-19

Como se referiu, o quadro inflamatório, de maior ou menor gravidade e de duração mais ou menos prolongada, é um achado comum em todos os doentes com COVID-19. É também reconhecido que nas doenças inflamatórias crónicas e neoplásicas, a resposta inflamatória é responsável por distúrbios no metabolismo do ferro, na função da eritropoietina (EPO), na eritropoiese e no tempo de semivida dos eritrócitos (45, 46). Por consequência, os indivíduos com doenças inflamatórias crónicas ou neoplásicas podem desenvolver uma anemia normocítica, normocrómica, ligeira a moderada, associada a uma redução no valor de ferro sérico e a valores de ferritina normais a aumentados (45, 46). Se coexistir uma deficiência em ferro absoluta ou se esta se desenvolver no decorrer da doença, a anemia pode evoluir para microcítica e hipocrómica (46).

Esta anemia é habitualmente de instalação lenta, não se observando um decréscimo clinicamente significativo na contagem de eritrócitos e na concentração de Hb durante semanas a meses após o início da resposta inflamatória (46). No entanto, em doentes críticos, com um quadro inflamatório grave, o desenvolvimento e progressão da anemia da inflamação pode ser acelerado (46).

4.1 Metabolismo do ferro

Considerando a associação da inflamação com distúrbios no metabolismo do ferro, a avaliação de marcadores analíticos de *status* de ferro, como o ferro, ferritina e transferrina é essencial para o diagnóstico diferencial da anemia da inflamação (45). A avaliação da hepcidina, apesar da sua importância na regulação do metabolismo do ferro, não é ainda incluída na prática clínica.

O ferro é um elemento essencial a vários processos bioquímicos no organismo humano. É também o componente funcional da Hb, que permite a ligação e o transporte de oxigénio (O₂) aos tecidos (45-48). Outra função do ferro é a de catalisar a produção de radicais livres (reação de *Fenton*), que podem causar lesões oxidativas em diferentes tecidos e órgãos e, eventualmente, a sua disfunção ou falência (45, 46, 49).

O ferro é absorvido pelas células endoteliais duodenais proximais, na forma de ferro heme, através da proteína HCP1 (*Heme Carrier Protein 1*), ou como ferro não-heme, através da proteína transmembranar DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) (Figura 5). O ferro não-heme, no estado férrico (Fe³⁺), é reduzido pelo citocromo B duodenal ao estado

ferroso (Fe^{2+}) antes de ser transportado através da membrana celular pela proteína DMT1 (45, 48). O ferro absorvido pode ser armazenado, como ferritina, nas células endoteliais duodenais, ou ser transportado para a corrente sanguínea via ferroportina 1 (FPN1). A FPN1 existe também na membrana celular de hepatócitos e macrófagos, sendo responsável pela mobilização de ferro dos hepatócitos e dos macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE) para a circulação.

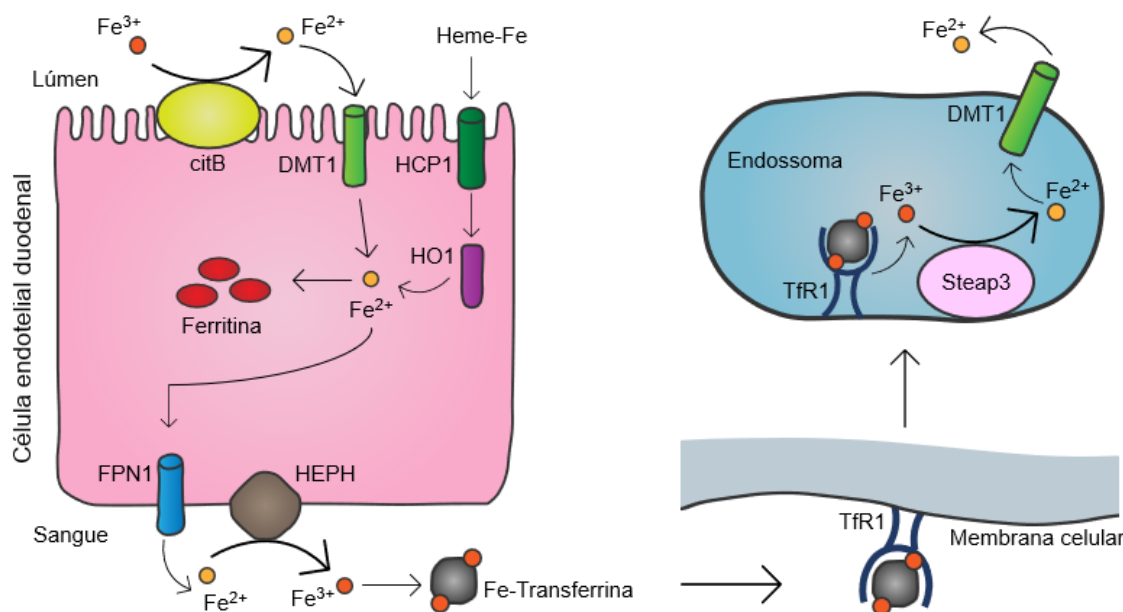


Figura 5. Esquema da absorção do ferro pelas células endoteliais duodenais e mobilização do ferro para outras células do corpo.

citB – Citocromo B; DMT1 – *Divalent Metal Transporter 1*; Fe – Ferro; FPN1 – Ferroportina 1; HCP1 – *Heme Carrier Protein 1*; HEPH – *Hephaestin*; HO1 – *Heme Oxygenase 1*; TfR1 – Receptor de Transferrina 1.

Na membrana basolateral dos enterócitos duodenais, o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} pela HEPH (Hephaestina), ligando-se de seguida 2 átomos de Fe^{3+} a uma molécula de transferrina (Figura 5) (45). A transferrina diférrica liga-se aos respetivos recetores (TfR), existentes na membrana das células, sendo internalizada em endossomas, onde, em meio ácido, o Fe^{3+} é libertado e posteriormente reduzido pela Steap3 (45, 48).

A maior parte do ferro é armazenada nos hepatócitos e nos macrófagos do SRE. Enquanto os hepatócitos adquirem ferro pela captação de transferrina diférrica/TfR, os macrófagos armazenam o ferro resultante da fagocitose e digestão de eritrócitos senescentes (eritrofagocitose) (45).

O ferro ligado à transferrina tem como destino principal os eritroblastos da medula óssea, para a síntese do grupo heme da Hb (46). Os eritrócitos são produzidos na medula óssea através da diferenciação e proliferação de células estaminais hematopoiéticas multipotentes e de células progenitoras. Para uma eritropoiese normal são necessários nutrientes eritropoiéticos, vitamina B9 ou ácido fólico, vitamina B12 (cobalamina) e ferro. O regulador específico da eritropoiese é a EPO (45). Em indivíduos saudáveis, a síntese de EPO, quase exclusivamente renal, é regulada pelo valor de oxigenação tecidual, de forma a manter o equilíbrio entre a produção de eritrócitos e a sua destruição/remoção (45).

A Hb é uma proteína conjugada com estrutura quaternária, sendo composta por quatro cadeias globínicas (2 do tipo α e 2 do tipo β) e quatro grupos heme (Fe^{2+} + protoporfirina). As duas vias metabólicas para a síntese de Hb incluem produção das cadeias globínicas e a síntese do grupo heme (50). A síntese das cadeias globínicas ocorre no citosol das células eritroides por transcrição e tradução genética. A síntese do heme nas células eritroides decorre nas mitocôndrias e no citosol. O oxigênio é transportado no sangue pela Hb dos eritrócitos, ligando-se ao Fe^{2+} do grupo heme (50).

Os eritrócitos circulam por cerca de 120 dias, após os quais os eritrócitos senescentes são fagocitados pelos macrófagos do SRE, que internalizam os eritrócitos via fagocitose e libertam o ferro das subunidades heme por ação da enzima HO1 (*Heme Oxygenase 1*) (Figura 5) (45). O ferro é transportado para o citosol pela proteína DMT1, onde é armazenado em ferritina ou libertado na circulação, via FPN1. Na medula óssea, os macrófagos residentes desempenham um papel importante no armazenamento local do ferro, para utilização na eritropoiese.

4.1.1 Regulação do metabolismo do ferro

O metabolismo do ferro é rigidamente regulado, para evitar danos celulares resultantes de sobrecarga de ferro, e anemia, devido ao desenvolvimento de deficiência de ferro (46, 51).

A hepcidina, sintetizada maioritariamente no fígado, é a principal reguladora do metabolismo do ferro (Figura 6). A hepcidina circulante liga-se à FPN1 da membrana dos enterócitos, macrófagos e hepatócitos, promovendo a sua internalização e degradação, ou seja, impedindo a libertação de ferro pelas células. A degradação da FPN1 reduz absorção intestinal de ferro, a libertação do ferro reciclado pelos macrófagos e de ferro armazenado nos hepatócitos, o que se reflete numa redução de ferro sérico (45-48).

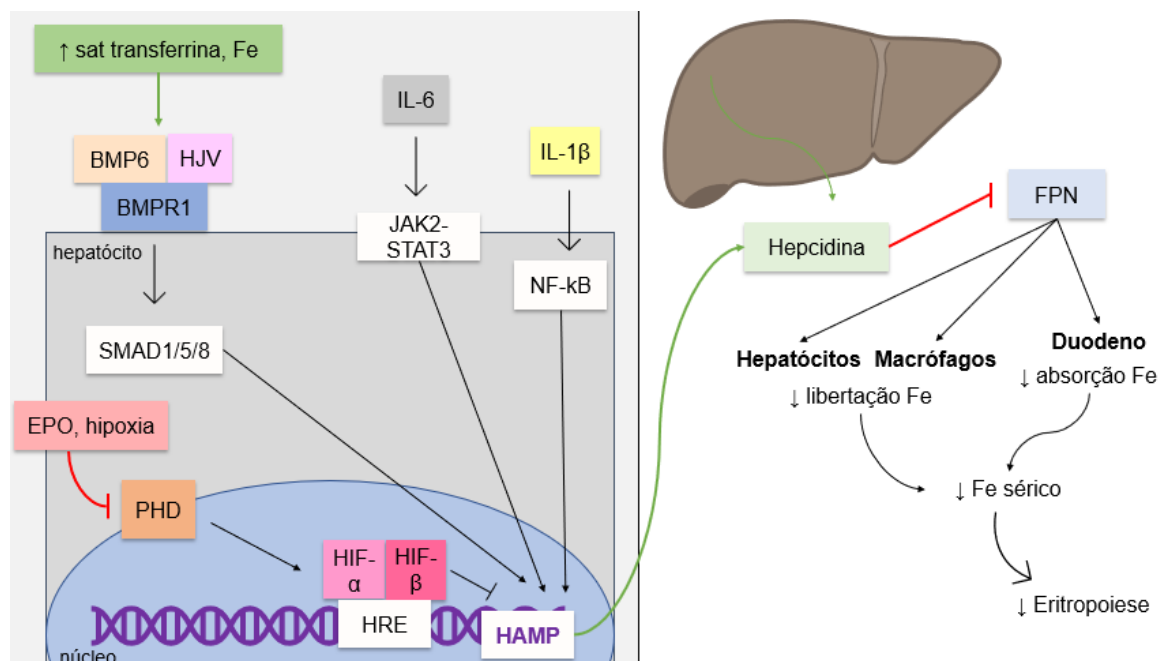


Figura 6. Esquema das vias e fatores que regulam síntese de hepcidina e ação da hepcidina no metabolismo do ferro.

BMP6 - *Bone Morphogenetic Protein 6*; BMPR1 – Recetor BMP tipo 1; EPO – Eritropoietina; Fe – Ferro; FPN – Ferroportina; HJV – *Hemojuvelin*; HIF – *Hypoxia Inducible Factors*; HRE – *Hypoxia Responsive Elements*; IL – Interleucina; JAK2-STAT3 - *Janus Kinase 2 - Signal Transducer And Activator Of Transcription Proteins 3*; NF-Kb – *Nuclear Factor Kappa B*; PHD – *Prolyl Hydroxylases Domain*.

São vários os fatores que regulam a síntese de hepcidina, estimulando ou inibindo a sua síntese. O aumento da saturação da transferrina e da IL-6 e IL-1β estimulam a síntese de hepcidina; pelo contrário, outros fatores como a EPO, hipoxia e a matriptase-2, inibem a síntese de hepcidina (45, 46, 48).

A BMP6 (*Bone Morphogenetic Protein 6*) é um indutor da produção de hepcidina, sendo expressa pelo fígado em resposta ao aumento da saturação de transferrina (Figura 6). A BMP6 liga-se ao recetor BMP tipo 1 em conjunto com o coreceptor HJV (*Hemojuvelina*), aumentando a expressão do gene *HAMP*, via sinalização SMAD1/5/8 (45). A via BMP/SMAD pode ser modulada por várias proteínas, incluindo HFE (*Human Hemochromatosis Protein*) e TfR2. Concentrações altas de ferro ligado à transferrina, que se liga competitivamente ao TfR1, provocam o deslocamento da proteína HFE, que se associa ao TfR2. O complexo formado interage com a HJV e ALK3 (*Activin Receptor-like Kinase 3*), prevenindo a sua degradação e, consequentemente, induzindo a expressão do gene *HAMP*. Por outro lado, a IL-6 aumenta a síntese de hepcidina através da via JAK2-STAT3 (*Janus Kinase 2 - Signal Transducer And Activator Of Transcription Proteins 3*) e a IL-1β pela via NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B*) (45, 46).

A síntese de hepcidina e, por consequência, o metabolismo do ferro, é também regulada por HIFs (*Hypoxia Inducible Factors*) (Figura 6) (45). Os HIFs respondem à

diminuição da disponibilidade de oxigênio, alterando o metabolismo do ferro e aumentando a expressão da EPO. O HIF é um fator de transcrição composto por uma subunidade α e outra β . Em condições de oxigenação tecidual normais, o HIF- α é hidroxilado, ubiquitinado e degradado proteoliticamente, enquanto o HIF- β é expresso constitutivamente. As enzimas PHD (*Prolyl Hydroxylases Domain*) catalisam a hidroxilação do HIF- α na presença de oxigênio (45). Sob condições de hipoxia, o HIF- α não é hidroxilado, liga-se às subunidades β formando HIF, que é translocado para o núcleo. Este complexo HIF liga-se aos HRE (*Hypoxia Responsive Elements*), induzindo a expressão de genes que codificam para a síntese de moléculas de adaptação/resposta à hipoxia.

4.1.2 Deficiência em ferro

Duas formas de deficiência em ferro são reconhecidas: deficiência absoluta em ferro e deficiência funcional em ferro (52).

A deficiência absoluta em ferro é a depleção do ferro total, especialmente das reservas de ferro dos macrófagos e hepatócitos (52, 53). Como a maioria do ferro é consumida para a síntese de Hb, a anemia é o sinal mais evidente de deficiência de ferro (53).

A deficiência funcional em ferro é definida por reservas de ferro normais ou aumentadas que não estão disponíveis para incorporação em precursores eritroides para a eritropoiese (52, 54). A deficiência funcional em ferro deve-se principalmente ao aumento dos níveis de hepcidina e é observada em indivíduos com doenças infecciosas, inflamatórias e malignas (52, 54).

O diagnóstico diferencial da deficiência em ferro é feito através da saturação da transferrina e dos níveis séricos de ferritina (Tabela 1).

Tabela 1. Diagnóstico diferencial da deficiência absoluta em ferro e da deficiência funcional em ferro.

Deficiência em ferro	Saturação da transferrina %	Ferritina $\mu\text{g/L}$
Absoluta	< 20	< 30 ♂ < 15 ♀
Funcional	20 - 30	> 100

4.2 Anemia na COVID-19

4.2.1 Inflamação e metabolismo do ferro

A eritropoiese e o tempo de vida dos eritrócitos, podem ser afetados por processos inflamatórios, como os que ocorrem na COVID-19 (Figura 7) (45, 46, 49). O aumento da produção e ativação de leucócitos, acompanhado pelo aumento da produção de citocinas, interleucinas e metabolitos de oxigênio, nos processos inflamatórios afetam a síntese de hepcidina, o metabolismo do ferro, a eritropoiese e a sobrevivência dos eritrócitos (45, 46).

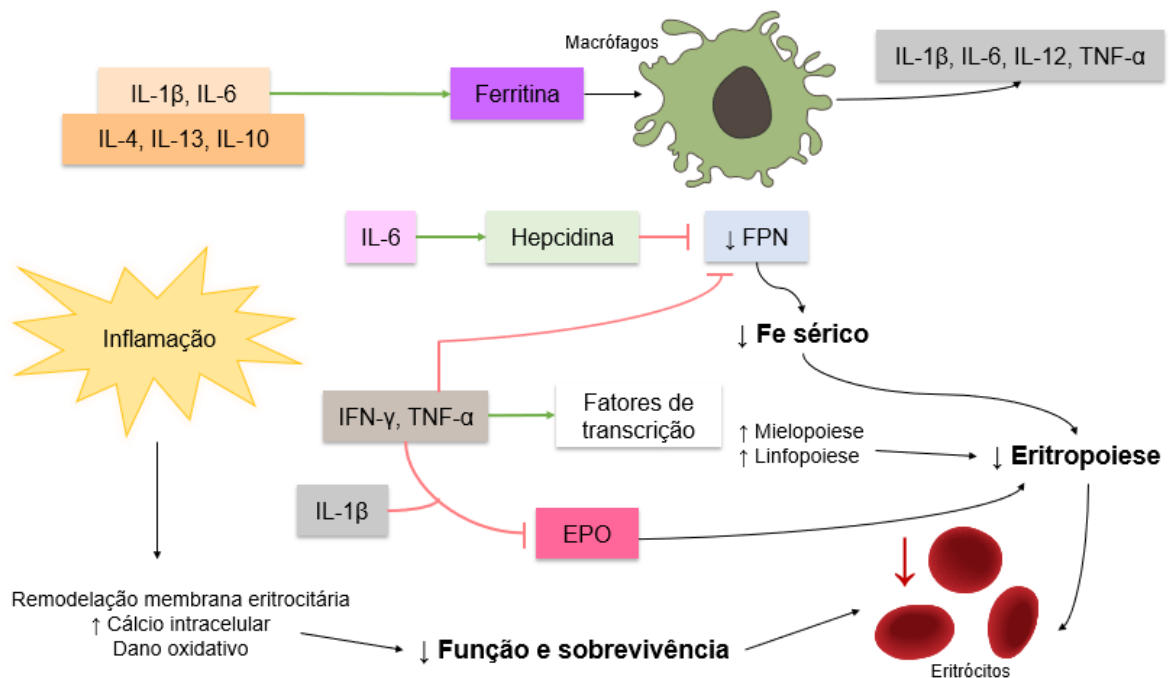


Figura 7. Fisiopatologia da anemia da inflamação.

EPO – Eritropoietina; Fe – Ferro; FPN – Ferroportina; IFN – Interferon; IL – Interleucina; TNF – *Tumor Necrosis Factor*.

Desde o início da pandemia, os estudos clínicos mostraram que a COVID-19 está associada a uma infecção sistêmica dos doentes, afetando principalmente os sistemas respiratório e hematopoiético (55). A concentração da Hb e, em muitos casos também o número de eritrócitos, diminuem na COVID-19 (15, 21, 22, 27, 37, 38). A prevalência da anemia em doentes infectados por SARS-CoV-2 foi relatada em vários estudos e correlacionada com a gravidade da doença (15, 17).

A hepcidina, para além de regular o metabolismo do ferro, é uma proteína de fase aguda sintetizada em condições de inflamação através de vias dependentes de IL-6 e TLR4 (*Toll-like Receptor 4*). O seu aumento determina uma redução da disponibilidade de ferro

para a eritropoiese, que se pode traduzir numa deficiência funcional em ferro, e desenvolvimento de anemia (45, 46, 48).

Em indivíduos com COVID-19 existem evidências de alteração do metabolismo do ferro (Figura 8). Os valores de ferritina e de hepcidina, ambas biomarcadores de fase aguda, aumentam, particularmente na doença grave (18, 21-24). Por outro lado, os valores de ferro sérico, da saturação da transferrina e da capacidade total de fixação do ferro (CTFF) diminuem, o que é característico da deficiência funcional em ferro, que se associa ao processo inflamatório (21, 56). A transferrina também pode estar diminuída em casos de doença grave (57).

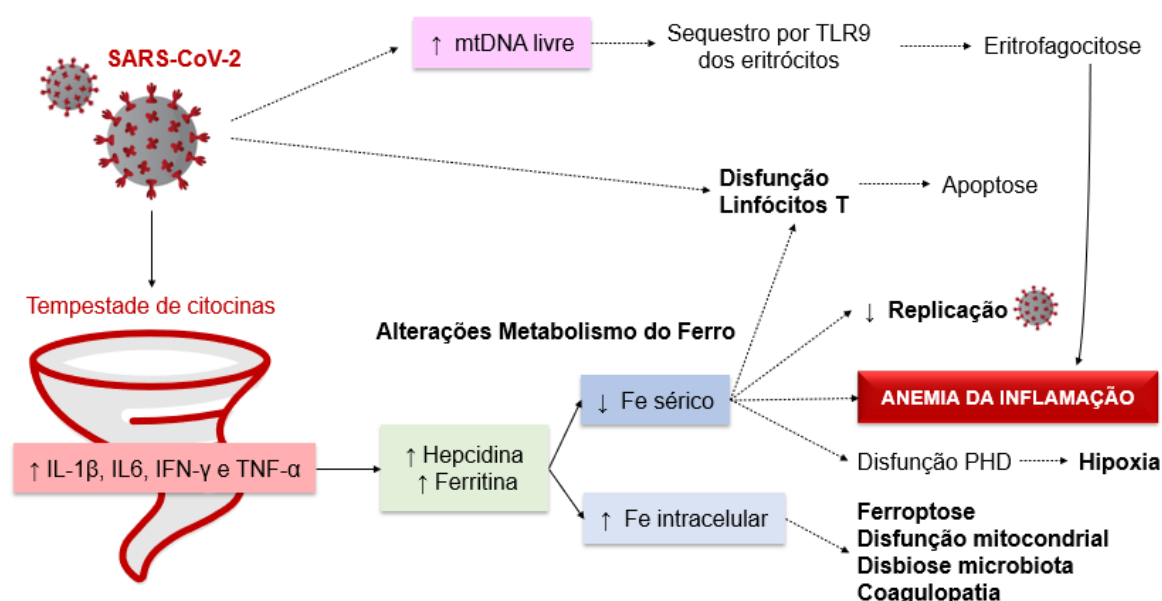


Figura 8. Possível fisiopatologia da anemia da inflamação associada à COVID-19 e de outras complicações associadas à infecção por SARS-CoV-2 e alterações do metabolismo do Ferro.

Fe – Ferro; IFN – Interferon; IL – Interleucina; mtDNA – DNA Mitocondrial; PHD – *Prolyl Hydroxylases*; TNF – *Tumor Necrosis Factor*.

Para além do aumento da expressão da hepcidina, as citocinas pró-inflamatórias usam ainda outros mecanismos de redução da disponibilidade de ferro (Figura 7). O IFN-γ e o TNF-α estimulam a expressão de DMT1 e inibem a expressão de FPN1 (45). Simultaneamente, as IL-1 e IL-6, mas também outras citocinas anti-inflamatórias, como as IL-4, IL-13 e IL-10, estimulam a síntese de ferritina (45, 46, 49). Foi recentemente demonstrado que a ferritina é capaz de estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (IL-1β, IL-6, IL-12 e TNF-α), atuando, desta forma, como um potencializador pró-inflamatório adicional e perpetuando um ciclo de inflamação (47, 49).

O IFN-γ, a IL-1β e o TNF-α inibem diretamente a expressão renal de EPO, reduzindo a eritropoiese. Além disso, estas citocinas inibem a proliferação e diferenciação

de células progenitoras eritroides diretamente (45, 46). Citocinas inflamatórias como o TNF- α e IFN- γ ativam fatores de transcrição que promovem a mielopoiese e linfopoiese, afetando a eritropoiese (45, 46). O IFN- γ e o TNF- α promovem também a degradação e fagocitose dos eritrócitos, reduzindo assim o tempo de semivida dos eritrócitos (45, 46). A inflamação induz a remodelação da membrana eritrocitária, o aumento da concentração de cálcio intracelular e o dano oxidativo dos eritrócitos que têm a sua função e sobrevivência alteradas (45, 49).

A resposta inflamatória mediada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL6, IFN- γ e TNF- α foi largamente reportada em doentes infectados por SARS-CoV-2 (18, 26, 28, 29, 37, 58) (Figura 8).

A resposta inflamatória e as consequentes alterações no metabolismo do ferro podem ainda ter outras consequências na COVID-19.

O valor absoluto de linfócitos está reduzido, na maioria dos doentes, o que sugere que o SARS-CoV-2, à semelhança do SARS-CoV, pode atuar nos linfócitos (22). O SARS-CoV-2 pode escapar aos mecanismos de defesa, induzindo a apoptose e a disfunção das células T, face à ocorrência de uma maior expressão de citocinas pro-inflamatória (Figura 8) (9). A diminuição do ferro sérico pode contribuir para a disfunção das células T que é relatada na COVID-19, já que os linfócitos quando proliferam, requerem ferro para sustentar a alta demanda metabólica (18-20, 47, 55). A ferritina também tem efeitos inibitórios a nível dos linfócitos (49). Na presença de CXCL12, a ferritina liga-se diretamente ao CXCR4 (C-X-C *Chemokine Receptor* 4) e induz a síntese de IL-10 (59). Por sua vez, a IL-10 vai promover a diferenciação de células T reguladoras, resultando na supressão da resposta imune (60). A ferritina também parece inibir a produção de CD2, que tem um papel importante na ativação dos linfócitos T (49).

Para além do impacto nas células hematológicas, existem evidências de múltiplas interações entre o metabolismo do ferro e a função respiratória pulmonar, especialmente em distúrbios de hipoxia (47). A atividade das enzimas PHD, reguladoras dos HIFs, é dependente de ferro. Assim, a deficiência funcional de ferro observada em doenças inflamatórias pode afetar a regulação de oxigénio celular e contribuir ainda mais para a hipoxia, grave em doentes críticos COVID-19 (Figura 8).

O aumento de hepcidina e ferritina como resultado da hiperinflamação associada à infeção por SARS-CoV-2, pode conduzir a danos nos tecidos (Figura 8). O excesso de ferro intracelular pode causar ferroptose, um processo de morte celular programada mediada por mecanismos de peroxidação dependentes de ferro, comum em patologias inflamatórias, e que pode envolver vários órgãos, incluindo o fígado, rim, coração e pulmão

(21, 61). A ferroptose está associada a distúrbios neurológicos, incluindo comprometimento cognitivo, ageusia e anosmia, manifestações comuns da COVID-19. Na infecção por SARS-CoV-2, o impacto da sobrecarga de ferro na disfunção mitocondrial e na disbiose pode ser significativo (61). A coagulopatia é também uma consequência possível da toxicidade do ferro, em que o ferro oxidado interage com proteínas da cascata de coagulação.

4.2.2 Expressão de TLR9 e eritrofagocitose

Foi demonstrado recentemente que os eritrócitos atuam como sensores imunológicos através da expressão do recetor TLR9 (62). Os TLRs identificam ácidos nucleicos derivados de células do hospedeiro e de agentes patogénicos, promovendo a secreção de citocinas inflamatórias, proliferação e maturação de células imunes.

O aumento de DNA livre contendo regiões CpG é um marcador de infecção e lesão. O sequestro de mtDNA (DNA mitocondrial) livre, por eritrócitos, mediado por TLR9, representa um mecanismo de proteção que elimina ácidos nucleicos tóxicos (62). A ligação de DNA livre ao TLR9 determina alterações na membrana dos eritrócitos, como a perda funcional de CD47, que tem como consequência a aceleração da eritrofagocitose e a ativação da imunidade inata através de células apresentadores de antígeno (62). O aumento da eritrofagocitose, como foi referido, pode ter implicações para a patogénese da anemia em várias doenças inflamatórias.

O mtDNA ligado a eritrócitos está elevado em doentes com infecção por SARS-CoV-2; os doentes COVID-19 com anemia apresentaram valores mais elevados de mtDNA associado a eritrócitos, do que os doentes não anémicos (62). Assim, o mtDNA ligado a eritrócitos em doentes COVID-19 poderá estar correlacionado com a anemia e a gravidade da doença (Figura 8).

4.2.3 Hemólise e alterações morfológicas dos eritrócitos

Na infecção por SARS-CoV-2 também existem relatos de anemia por hemólise dos eritrócitos (63). A sepsis e a hipoxia têm efeitos na morfologia e sobrevivência dos eritrócitos, contribuindo para a complexa patogénese da anemia na COVID-19 (42).

A hemólise pode ocorrer devido ao ambiente altamente oxidativo presente na COVID-19 (63). Existe um desequilíbrio no estado redox em situações inflamatórias, infecciosas ou não, que promove o estresse oxidativo nos tecidos (64). Este estresse oxidativo resulta do aumento da produção de radicais livres, nomeadamente espécies reativas de oxigénio, que atacam estruturas importantes das células, e da redução dos mecanismos antioxidantes. No citoplasma das células hepáticas, o ferro intracelular livre

encontra-se disponível para participar nas reações de oxidação-redução e, consequentemente, para gerar radicais livres (64).

Na infecção por SARS-CoV-2, as alterações morfológicas dos eritrócitos sugerem que o vírus pode ter um impacto significativo na fisiologia destas células, nomeadamente através do seu papel no estresse oxidativo (41). Eritrócitos em forma de cogumelo são uma característica da esferocitose hereditária associada à deficiência de proteína banda 3, mas também podem ser observados na hemólise induzida por estresse oxidativo (41). A presença destas células na infecção por SARS-CoV-2 sugere um possível papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença (41, 64).

Por outro lado, foi demonstrado que a ligação do DNA contendo regiões CpG, leva a alterações na distribuição da banda 3 na membrana dos eritrócitos (62). A deficiência de proteína banda 3 afeta as propriedades da membrana, a estabilidade mecânica e a função dos eritrócitos (64). As alterações na membrana eritrocitária podem resultar na redução da capacidade de deformabilidade e perda da morfologia bicôncava, particularidades que são observadas em doentes COVID-19 (36, 39-43, 64).

Na infecção por SARS-CoV-2 foram também identificados nos eritrócitos danos estruturais em proteínas e alterações na remodelação de lípidos da membrana, que podem ser potenciais causas da deficiência no fornecimento de oxigénio que é observada nesta doença (39, 65). As propriedades físicas dos eritrócitos são cruciais para o fluxo microcirculatório e, como tal, essas alterações podem prejudicar a circulação, promover hipoxemia e a hemólise.

5 Prevalência da anemia

Diversos estudos relatam a prevalência de anemia em doentes diagnosticados com COVID-19, na admissão hospitalar (Tabela 2).

A prevalência da anemia na admissão em doentes COVID-19 variou extensamente nos diferentes estudos. A maioria dos estudos apresenta prevalências de anemia entre os 30% e os 50% (66-72). Bergamaschi *et al.* e Oh *et al.* apresentam prevalências superiores (61% e 60%, respetivamente) (73, 74); por outro lado, Bellmann-Weiler *et al.* e Zhou *et al.* reportam prevalências inferiores (25% e 15%, respetivamente) (75, 76).

Tabela 2. Percentagem e número (n) de doentes COVID-19 com anemia na admissão hospitalar e respetiva gravidade, reportados em diversos estudos.

Estudo	Doentes	Anemia % (n)	Ligeira n	Moderada n	Severa n
Bellmann-Weiler <i>et al.</i> (75)	259	25 (64)	38	21	5
Lanser <i>et al.</i> (66)	645	34 (221)	124	92	5
Tao <i>et al.</i> (67)	222	36 (79)	46	29	4
Chen <i>et al.</i> (68)	137	45 (61)	38	21	2
Bergamaschi <i>et al.</i> (73)	206	61 (126)	91	35	
Oh <i>et al.</i> (74)	733	60 (438)	105	333	
Tremblay <i>et al.</i> (69)	2563	31 (793)	NR	NR	NR
Dinevari <i>et al.</i> (70)	1274	48 (615)	NR	NR	NR
Elkhalifa <i>et al.</i> (71)	257	47 (120)	NR	NR	NR
Giacomelli <i>et al.</i> (72)	233	48 (111)	NR	NR	NR
Zhou <i>et al.</i> (76)	191	15 (29)	NR	NR	NR

NR, não reportado.

Alguns estudos focaram os valores da concentração de Hb em doentes infetados com SARS-CoV-2. Em concordância com os principais resultados da prevalência de anemia, a maioria dos estudos observou que entre 30 a 40% dos doentes apresentavam valores diminuídos de Hb (20, 27, 37). Os estudos de Chen *et al.* e de Pezeshki *et al.* apresentaram percentagens superiores (51% e 74%, respetivamente) (36, 68); e apenas no estudo de Linssen *et al.* foi reportada uma percentagem inferior (27%) (77).

Assim, a anemia representa uma comorbilidade relativamente comum em doentes COVID-19, podendo afetar entre 15 a 61% dos doentes infetados por SARS-CoV-2.

Na maioria dos estudos que classificaram o grau de gravidade da anemia, a anemia ligeira foi a forma mais prevalente (de 56% a 72%) (66-68, 73, 75). No estudo de Oh *et al.*, a anemia moderada/severa (76%) foi a mais comum (74).

Ao investigar a existência de anemia pré-COVID, Lanser *et al.* verificaram que os níveis de Hb de 249 doentes, eram de 129 g/L numa média de 104 dias antes da admissão hospitalar, não diferindo significativamente dos níveis de Hb, de 130 g/L, apresentados pelos doentes na admissão hospitalar por COVID-19 (66). Porém, Oh *et al.* reportaram que a maioria dos doentes com histórico de anemia apresentavam anemia na admissão

hospitalar por COVID-19 (81,6%) e que a anemia pré-COVID se correlacionava significativamente com a gravidade da anemia apresentada na admissão (74).

Sonnweber *et al.* avaliaram doentes COVID-19 dois meses após o início da doença COVID-19 (78). A anemia foi observada em 9,2% dos indivíduos, sendo mais frequente no sexo masculino (12%) do que no feminino (5%). A gravidade da doença estava fortemente correlacionada com a prevalência de anemia, 90% dos doentes com anemia tinham tido doença grave e crítica. Os doentes com anemia sofriam principalmente de anemia da inflamação (70%) ou formas combinadas de anemia da inflamação e ferripriva.

Vários dos estudos que tiveram como foco a concentração de Hb em doentes infectados com SARS-CoV-2, compararam esses valores com os de doentes não COVID internados na mesma unidade hospitalar ou com os de pessoas saudáveis (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos níveis de Hb entre doentes COVID-19, doentes não COVID e pessoas saudáveis.

Estudo	Hb Doentes COVID-19 g/L (n)	Hb Doentes não COVID g/L (n)	Hb Controlo g/L (n)	Valor <i>p</i>
Bastin <i>et al.</i> (21)	NR (147)	NR (39)	NR	< 0,001
Elkhalifa <i>et al.</i> (71)	125 ± 17,6 (257)	129,6 ± 15 (257)	NR	0,001
Bergamaschi <i>et al.</i> (73)	118 ± 23 (206)	126 ± 18 (71)	NR	0,008
Omrani-Nava <i>et al.</i> (79)	132 ± 10,4 (86)	NR	141 ± 16 (186)	0,42
Sadigh <i>et al.</i> (35)	103 ± 23 (27)	101 ± 24,8 (14)	NR	0,84
Linssen <i>et al.</i> (77)	132 [89–163] (923)	NR	141 [119–166] (12782)	NR
Martens <i>et al.</i> (33)	133,7 [120,9–146,6] (384)	133,7 [119,2–146,6] (587)	NR	NR

Resultados apresentados como média ± desvio padrão ou mediana [interquartis].

NR, não reportado; n, número de doentes.

Ao comparar os valores de Hb de doentes COVID-19 com doentes não COVID, os resultados não são consensuais. A maioria dos estudos verificaram que os valores de Hb de doentes COVID-19 são significativamente mais baixos (21, 71, 73). Pelo contrário, o estudo de Sadigh *et al.* apresentou resultados em que os doentes não COVID têm um valor de Hb ligeiramente inferior (33, 35).

Segundos os estudos de Omrani-Nava *et al.* e Linssen *et al.*, os valores de Hb em doentes COVID-19 são inferiores aos de pessoas saudáveis, mas a diferença não era estatisticamente significativa ($p = 0,42$) ou não foi reportada, respetivamente (77, 79).

Lanser *et al.* monitorizaram os valores de Hb, ferritina e transferrina após a alta hospitalar de 175 doentes COVID-19 com anemia aquando da admissão hospitalar (66). Os níveis de Hb aumentaram para valores normais (média, de 137 g/L), após cerca de 122 dias de alta hospitalar. Os níveis de ferritina diminuíram para 142 g/L e os níveis de transferrina aumentaram para 253 mg/dL.

5.1 Classificação etiológica da anemia

Dos estudos anteriormente referidos, apenas alguns identificaram o tipo de anemia, de acordo com o *status* de ferro (Tabela 1), anemia da inflamação, anemia ferripriva, e anemia não classificada foram as referidas (66, 73, 75, 78, 80).

A maioria dos doentes COVID-19 com anemia apresentava anemia da inflamação (56%, 65%, 69% e 70%); em concordância, estes doentes apresentavam níveis significativamente elevados de PCR, IL-6 e procalcitonina (66, 73, 75, 78).

No estudo de Lanser *et al.*, a hiperinflamação na admissão hospitalar (PCR > 15 mg/dL ou ferritina > 1500 µg/L) estava associada a um declínio significativamente maior dos níveis de Hb na primeira semana e após duas semanas de hospitalização (66).

Apesar de nos outros estudos não ser identificada a anemia apresentada pelos doentes, esta foi sempre associada a valores elevados de marcadores inflamatórios. Chen *et al.* verificaram que os níveis séricos de IL-6 estavam elevados em doentes COVID-19 com anemia e Tao *et al.* mostraram que os níveis de PCR, procalcitonina e VS eram significativamente mais elevados nos doentes com anemia (67, 68).

6 Valor prognóstico da anemia

A anemia, independentemente da patologia subjacente, representa um risco significativo para hospitalização e mortalidade (15, 17).

Avaliada a prevalência da anemia em doentes com infeção por SARS-CoV-2, diversos estudos tentaram estabelecer uma correlação entre a anemia e a evolução clínica e gravidade da doença, avaliando se esta tinha uma associação significativa com a duração da hospitalização, admissão em UCI (Unidade de Cuidados Intensivos) e mortalidade (Tabela 4).

Tabela 4. Associação da anemia em doentes COVID-19 e respetivo valor preditivo em relação à duração de hospitalização, admissão na UCI e mortalidade.

Estudo	Duração hospitalização dias			Valor <i>p</i> U (M)			Admissão UCI % (n)			Valor <i>p</i> U (M)			Mortalidade % (n)			Valor <i>p</i> U (M)		
	s/ Anemia	c/ Anemia		s/ Anemia	c/ Anemia		s/ Anemia	c/ Anemia		s/ Anemia	c/ Anemia		s/ Anemia	c/ Anemia		s/ Anemia	c/ Anemia	
Bellmann-Weiler <i>et al.</i> (75)	9 [5–15]	12 [7–20]		0,062			21 (41)	18,8 (12)		0,696			8,2 (16)	25 (16)		0,001 (0,022)		
Bergamaschi <i>et al.</i> (73)	12 [7–19]	13 [7–25]		0,562			NR	NR		NR			NR	NR		NR		
Oh <i>et al.</i> (74)	9 ± 12	12 ± 13		0,012			13,6 (40)	18 (79)		0,19			24,4 (72)	33,6 (147)		0,017 (0,046)		
Dinevari <i>et al.</i> (70)	NR	NR		NR			20,63	35,93		< 0,001 (< 0,001)			13,8	23,9		< 0,001 (0,01)		
Lanser <i>et al.</i> (66)	NR	NR		NR			NR	NR		< 0,001 ^a 0,140 ^b			NR	NR		0,364 ^a 0,009 ^b		
Tao <i>et al.</i> (67)	NR	NR		NR			NR	NR		NR			0 (0)	3,8 (3)		0,044 (0,996)		
Giacomelli <i>et al.</i> (72)	NR	NR		NR			NR	NR		NR			NR	66,7 (32)		0,004 (0,429)		
Chen <i>et al.</i> (68)	NR	NR		NR			NR	NR		NR			0 (0)	6,6 (4)		0,037		

Resultados do tempo de hospitalização apresentados como média ± desvio padrão ou mediana [interquartis].
M – valor *p* no modelo multivariado; U – valor *p* no modelo univariado.
a – anemia com início 1 semana após admissão; b – anemia pré-existente; NR, não reportado.

Nos diversos estudos, os doentes COVID-19 com anemia eram mais velhos e apresentavam um maior número de comorbilidades (e.g. doença renal crónica, insuficiência cardíaca, diabetes, cancro) que os doentes sem anemia (67, 70, 73-75). Para além de um modelo univariável, alguns estudos usaram modelos multivariáveis de modo a ajustar os valores obtidos para a anemia de acordo com outras variáveis.

Relativamente à duração da hospitalização de doentes COVID-19, os resultados diferem nos diversos estudos. Oh *et al.* reportaram uma associação significativa entre a existência de anemia e um maior tempo de hospitalização (74). Porém, de acordo com Bellmann-Weiler *et al.* e Bergamaschi *et al.*, a existência de anemia não contribuiu para um aumento significativo da hospitalização (73, 75).

Quanto à admissão em UCI, Dinevari *et al.* verificaram nos doentes COVID-19 com anemia, um aumento significativo na admissão na UCI (70). No entanto, Bellmann-Weiler *et al.* e Oh *et al.* não observaram diferenças significativas na admissão na UCI de doentes COVID-19 com e sem anemia (74, 75). Apesar dos resultados apresentados não serem consensuais, no modelo multivariável, Dinevari *et al.* observaram uma associação significativa independente entre a anemia e o internamento na UCI (70). Lanser *et al.* verificaram que a ocorrência de anemia com início após uma semana de hospitalização estava associada a uma taxa maior de admissão na UCI, ao contrário do que acontecia nos casos de anemia pré-existente, em que o risco de internamento em UCI não aumentou significativamente ($p = 0,140$) (66).

Nos estudos de Chen *et al.* e Tao *et al.*, a proporção de doentes COVID-19 graves e críticos no grupo com anemia foi maior do que no grupo sem anemia (67, 68). Observou-se ainda que os doentes que apresentavam anemia aquando da admissão tiveram uma taxa significativamente maior de complicações graves, como sepsis (43,4% vs. 31,5%, $p = 0,015$) (74).

Apesar da mortalidade nos doentes COVID-19 variar nos diversos estudos, foi o parâmetro com resultados mais concordantes no que diz respeito à sua correlação com a anemia. A maioria dos estudos reportaram que a existência de anemia aquando da admissão hospitalar de doentes COVID-19 está associada a uma mortalidade significativamente maior durante a hospitalização (67, 68, 70, 72, 74, 75). Esta correlação manteve-se quando feito o ajuste para outras variáveis (70, 74, 75). Lanser *et al.* verificaram que a anemia com início após uma semana de hospitalização não estava associada a uma maior mortalidade, mas a anemia pré-existente foi preditiva de uma maior mortalidade durante a hospitalização (66).

6.1 Valor prognóstico da gravidade da anemia

Adicionalmente, foi estudada a relação entre gravidade da anemia em doentes COVID-19 e a duração da hospitalização, admissão em UCI e mortalidade.

Em relação ao tempo de hospitalização de doentes COVID-19 com anemia, Oh *et al.* reportaram que a anemia moderada/severa está associada a aumento significativo do tempo de internamento, quando comparado com o tempo de hospitalização de doentes com anemia ligeira (74).

Não foi encontrada uma relação significativa entre a gravidade da anemia e a admissão em UCI (74, 75). No entanto, Oh *et al.* relataram que a anemia moderada/severa estava significativamente associada a uma evolução clínica mais grave (74). Da mesma forma, verificou-se que os doentes com anemia moderada/severa foram mais propensos a apresentar dispneia e níveis mais baixos de PaO₂ (pressão parcial de oxigénio no sangue arterial) e de SaO₂ (saturação arterial de oxigénio) do que os doentes com anemia ligeira (67).

Na análise univariada, quer a anemia ligeira, quer a anemia moderada/grave, apresentavam uma associação significativa com a mortalidade (74, 75); porém, na análise multivariada, apenas a anemia moderada/grave se associava a uma mortalidade significativamente maior.

6.2 Valor prognóstico da concentração de Hb

A concentração de Hb foi avaliada em doentes COVID-19 com doença grave e doença não grave, de acordo com a classificação OMS (Tabela 5).

Em todos os estudos, os doentes com doença COVID-19 grave apresentaram valores mais baixos da concentração de Hb do que os doentes não graves (27, 56, 63, 66, 67, 74, 77, 81-85).

Lanser *et al.* e Guan *et al.* não referem a significância dos valores obtidos nos dois grupos de doentes (66, 85). No entanto, Lanser *et al.* reportaram que doentes com doença grave tiveram um declínio significativamente mais pronunciado nos níveis de Hb após uma e duas semanas (130 para 111 para 96 g/L) do que os doentes com doença não grave (131 para 117 para 113 g/L) (66).

Tabela 5. Níveis de hemoglobina (Hb) em doentes COVID-19 graves e doentes não graves (de acordo com a classificação OMS).

Estudo	Doença não grave Hb g/L (n)	Doença grave Hb g/L (n)	Valor <i>p</i>
Qian <i>et al.</i> (27)	135 [126–147] (82)	130 [118–142] (9)	0,276
Shah <i>et al.</i> (56)	133,2 ± 21,4 (20)	124,7 ± 16,7 (10)	0,280
Oh <i>et al.</i> (74)	112,2 ± 29,9 (296)	111 ± 29,1 (437)	0,658
Tao <i>et al.</i> (67)	128 [118–137] (202)	111,5 [104–128,3] (20)	0,002
Cen <i>et al.</i> (81)	124 [114–136] (409)	122 [110–135] (200)	0,006
El-Lateef <i>et al.</i> (82)	131 ± 20 (430)	102,4 ± 27,2 (32)	< 0,001
Linssen <i>et al.</i> (77)	134 [96–163] (557)	129 [84–165] (366) ^a	< 0,0001
Wang <i>et al.</i> (83)	134,5 ± 12,1 (131)	122,3 ± 27,3 (30)	0,000
Yousif <i>et al.</i> (84)	131 ± 15 (61)	114 ± 23 (279)	< 0,001
Yağcı <i>et al.</i> (63)	138,3 ± 16,1 (18)	98,5 ± 23,9 (22) ^a	< 0,0001
Lanser <i>et al.</i> (66)	134 [122–145] (432)	133 [119–144] (117)	NR
Guan <i>et al.</i> (85)	135 [120–148] (926)	128 [112–141] (173)	NR

Resultado apresentados como média ± desvio padrão ou como mediana [interquartis].

a – doentes críticos.

NR, não reportado; n, número de doentes.

A maior parte dos estudos demonstram uma associação significativa entre os níveis de Hb e a gravidade da doença COVID-19 (63, 67, 77, 81-84). Apenas os estudos de Qian *et al.*, Shah *et al.* e Oh *et al.* não encontraram uma associação significativa entre os níveis de Hb e a gravidade da doença COVID-19 ($p = 0,276$; $p = 0,280$ e $p = 0,658$, respetivamente) (27, 56, 74).

Alguns estudos compararam também os valores de hemoglobina em doentes com infeção por SARS-CoV-2, admitidos em UCI e fora da UCI. Em todos os estudos, os níveis de Hb são mais baixos em doentes UCI do que em doentes não UCI; porém, a significância dos valores não é consensual (26, 31, 44, 86). Os estudos de Pozdnyakova *et al.* e Fan *et al.* reportaram que os níveis de Hb eram significativamente mais baixos nos doentes admitidos em UCI (31, 86); no entanto, Huang *et al.* e Schapkaitz *et al.* não encontraram diferença significativa nos valores de Hb ($p = 0,20$ e $p = 0,68$, respetivamente) (26, 44).

Em relação à mortalidade da COVID-19, foram comparados os níveis de Hb em doentes sobreviventes e doentes que faleceram (Tabela 6).

Tabela 6. Associação dos níveis de hemoglobina (Hb) com a mortalidade da doença COVID-19.

Estudo	Sobreviventes Hb g/L (n)	Óbitos Hb g/L (n)	valor <i>p</i>
Foy <i>et al.</i> (38)	130 ± 20 (1365)	122 ± 24 (276)	< 0,001
Lanser <i>et al.</i> (66)	133 [119–144] (549)	123 [105–144] (96)	0,004
El-Lateef <i>et al.</i> (82)	131,2 ± 20 (439)	93,2 ± 26,1 (23)	< 0,001
Giacomelli <i>et al.</i> (72)	139 [130–148] (185)	132 [117–143] (48)	0,009
Yağcı <i>et al.</i> (63)	129,3 ± 19,7 (36)	103,8 ± 26,3 (23)	0,0001
Zhou <i>et al.</i> (76)	128 [119–140] (137)	126 [115–138] (54)	0,30
Chen <i>et al.</i> (87)	128 [118–138] (161)	128 [114–145] (113)	NR

Resultados apresentados como média ± desvio padrão ou mediana [interquartis].

NR, não reportado; n, número de doentes.

Destes estudos, a maioria mostrou que os níveis de Hb em doentes COVID-19 que faleceram eram significativamente inferiores aos níveis observados nos doentes sobreviventes (38, 63, 66, 72, 82). Apenas Zhou *et al.* não encontraram diferença significativa nos valores de Hb entre os 2 grupos ($p = 0,30$) e Chen *et al.* não reportaram o valor de p . (76, 87).

Al-Jarallah *et al.* estudaram dois grupos de doentes, um grupo com Hb < 100 g/L e outro com Hb > 100 g/L (88). A duração média do tempo de hospitalização foi significativamente maior no grupo com níveis mais baixos de Hb do que no grupo com níveis mais elevados. À semelhança de estudos anteriores, a mortalidade foi significativamente superior no grupo com níveis de Hb mais baixos do que no grupo com níveis de Hb mais elevados (88).

A Hb foi estudada como parâmetro indicador de prognóstico e de gravidade da doença COVID-19 (21); na análise ROC (*Receiver operator characteristic*), a Hb teve uma AUC (*Area under the curve*) de 81,71 (cutoff < 13,35 g/dL, $p < 0,001$) para prognóstico da doença e uma AUC de 62,86 (cutoff < 10,75 g/dL, $p = 0,03$) para gravidade da doença (21).

Estes resultados demonstram que anemia, poderá ser incluída em algoritmos que avaliam a previsão de risco de mortalidade e gravidade na COVID-19.

Linssen *et al.* desenvolveram e testaram um sistema *score* hemocitométrico de prognóstico da COVID-19 (77). Neste modelo, seis variáveis (N/L; índice granulócitos imaturos/linfócitos; % de monócitos reativos/monócitos; % de linfócitos produtores de anticorpos/linfócitos; diferença na hemoglobinizacão de reticulócitos e eritrócitos e nº de eritrócitos/L) recebem uma pontuação de 0 a um máximo de 4 pontos cada. A Hb foi um dos quatro parâmetros adicionados posteriormente ao modelo (Hb; % eritrócitos

hipocrômicos; nº de plaquetas/L e nº de plaquetas imaturas), com um máximo de 1 ponto cada. A soma das 10 variáveis compõe o valor final do *score* prognóstico, com um mínimo de 0 e um máximo de 28 pontos. O *score* de prognóstico identificou corretamente 70,5% dos doentes críticos durante os primeiros 3 dias após a admissão hospitalar, com um desempenho semelhante confirmado no cohort de validação (72,0%).

7 Possíveis terapêuticas adjuvantes

Atualmente, não existem recomendações terapêuticas específicas para a anemia na infecção por SARS-CoV-2. Tratando-se de uma anemia da inflamação, o tratamento a equacionar poderá ser semelhante ao de anemias noutras doenças inflamatórias.

A principal abordagem terapêutica na anemia da inflamação é a deteção e o tratamento da doença inflamatória subjacente, que geralmente resulta na resolução da anemia (45). O tratamento anti-inflamatório em doentes com anemia da inflamação, além da melhoria da doença inflamatória subjacente, demonstrou melhorar a anemia (45, 61).

7.1 Imunossupressão

A imunossupressão é essencial no tratamento de “tempestades” de citocinas, especialmente em doentes graves (6, 89). Os tratamentos de imunossupressão incluem o uso de corticosteroides, de antagonistas da IL-6, de inibidores de IFN- γ , IL-1 e TNF e inibidores de JAK (89).

Os corticosteroides foram amplamente utilizados no tratamento da SARS para reduzir a gravidade dos danos causados pela inflamação (89); no entanto, o seu uso na infecção por SARS-CoV-2 é controverso. A administração de corticosteroides em dosagens altas não apresentaram benefícios em doentes COVID-19 com lesões pulmonares graves (90). Os corticosteroides devem ser usados com prudência em doentes COVID-19 críticos, recomendando-se o uso em doses baixas a moderadas, por períodos curtos (91).

O uso de antagonistas de IL-6 no tratamento da COVID-19 está relacionado com o seu papel na inibição da hiperinflamação e síndrome de libertação de citocinas nas manifestações mais graves da doença (7, 11, 12, 21, 92). Atualmente, o uso de antagonistas de IL-6 não está incluído nas diretrizes de tratamento para a infecção por SARS-CoV-2, pois ainda não existem dados clínicos suficientes (92). Vários ensaios clínicos estão atualmente a decorrer para avaliar o efeito da sua administração em monoterapia ou terapêutica combinada. Em doentes COVID-19 hospitalizados, o uso de tocilizumab, um anticorpo monoclonal que bloqueia os recetores de IL-6, reduziu a

probabilidade de o doente necessitar de ventilação mecânica e foi também associado a uma menor mortalidade (93, 94).

Este tratamento pode ter efeitos a nível do metabolismo do ferro, pois ao reduzir a “tempestade” de citocinas, contribui para reduzir os níveis de hepcidina e ferritina e para aumentar o ferro sérico (21, 56).

Existem três terapias estabelecidas para o tratamento da anemia da inflamação, a suplementação de ferro, o uso de agentes estimuladores da eritropoiese e a transfusão de eritrócitos (45).

7.2 Suplementação de ferro

A terapia de reposição de ferro é um tratamento estabelecido em doentes com anemia da inflamação e deve ser considerada, especialmente em doentes com deficiência em ferro absoluta concomitante (45). A suplementação de ferro pode não ser eficaz na anemia da inflamação, tendo em conta que a deficiência de ferro nesta anemia é uma deficiência funcional e não absoluta (95). Assim, é necessário avaliar as reservas de ferro, através do doseamento da ferritina sérica.

O ferro pode ser suplementado com preparações de ferro orais ou intravenosas parenterais. A inflamação, por alterar a absorção intestinal de ferro, torna a suplementação oral de ferro menos eficaz ou ineficaz (45-48). Assim, a administração intravenosa de ferro pode ser usada em doentes com doenças inflamatórias. As preparações intravenosas têm também a vantagem de repor mais rapidamente os níveis de ferro. Por outro lado, apresentam custos mais altos e podem induzir reações anafiláticas, embora muito raras, mas graves (45).

7.3 Quelantes de ferro

Por outro lado, as alterações no metabolismo do ferro presentes na COVID-19 poderão ser alvo de intervenção terapêutica por tratamentos que modulam a disponibilidade de ferro, como quelantes de ferro (75). A desregulação do metabolismo do ferro, resultante da inflamação na COVID-19, pode determinar, como já se referiu, o desenvolvimento de ferroptose e estresse oxidativo, influenciando a resposta imune do doente (96). Os quelantes de ferro reduzem a sobrecarga de ferro e são recomendados em níveis de ferritina superiores a 1000µg (97).

Os quelantes de ferro ligam-se ao ferro, em excesso nas células, sendo depois excretado na urina. A terapêutica com quelantes de ferro tem sido usada noutras doenças

para tratar “tempestades” de citocinas e lesões de múltiplos órgãos em várias situações, incluindo lesão de isquemia-reperfusão, sepsis e infecções (21, 98).

Estes medicamentos exibem efeitos antivirais e imunomoduladores *in vitro* e *in vivo*, particularmente contra vírus de RNA (96, 98). A quelatação de ferro mostrou-se eficaz em várias infecções virais, incluindo HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus 1*) e hepatite B (21, 98). Estes agentes podem atenuar a SDRA e ajudar a controlar a infecção por SARS-CoV-2 por vários mecanismos, incluindo a inibição da replicação viral, diminuição da disponibilidade de ferro, regulação positiva de células B, melhoria do título de anticorpos antivirais neutralizantes, inibição da inflamação endotelial e prevenção da fibrose e declínio da função pulmonar, por redução da acumulação de ferro nos pulmões (96, 98).

A deferoxamina, a deferiprona e o deferasirox são os três principais quelantes de ferro aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de sobrecarga de ferro (96, 98). A quelatação de ferro foi proposta na COVID-19, devido à eficácia demonstrada em outras doenças virais (96). No entanto, em infecções por coronavírus, o mecanismo destes medicamentos ainda não foi explorado (21).

Novas estratégias de tratamento, com foco nos *stocks* restritos de ferro (macrofágicos) em doentes com anemia da inflamação ganharam interesse nos últimos anos (45). A mobilização de ferro armazenado nos macrófagos do SRE é provavelmente uma estratégia mais adequada do que a suplementação repetida de ferro. Existem duas novas estratégias terapêuticas principais para reorganizar os *stocks* de ferro: modificação (regulação negativa) da síntese e função da hepcidina e estabilização do HIF através da inibição de PHD (45, 56).

7.4 Agentes estimuladores da eritropoiese

O tratamento com agentes estimuladores da eritropoiese é uma terapia amplamente utilizada na anemia da inflamação e usada em doentes com doença renal crônica ou cancro (45).

A EPO leva à estimulação da proliferação e diferenciação de células eritroides (63, 99). Os recetores da EPO, presentes nas membranas das células eritroides, também estão presentes em células do pulmão, fígado, coração e cérebro (99, 100). Para além dos efeitos na eritropoiese, a EPO demonstrou ter efeitos citoprotectores, incluindo efeitos anti-isquémicos, regenerativos e antiapoptóticos em vários tecidos (63, 99, 100).

Vários estudos em modelos animais foram conduzidos para explorar as vias moleculares subjacentes aos efeitos não hematopoiéticos da EPO. Os efeitos protetores da EPO no tecido pulmonar foram atribuídos aos seus efeitos na inibição da expressão do

NF- κ B, inibição da IL-6 e do TNF- α e aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (63, 99-101). Em doentes em hemodiálise, o tratamento com rhEPO (Eritropoietina humana recombinante), durante seis meses, demonstrou levar à redução de processos inflamatórios ao elevar a produção de IL-10 e inibir a de TNF- α (99).

Considerando os prováveis benefícios da rhEPO na reversão da SDRA e outros efeitos da COVID-19, o tratamento com rhEPO poderá ser uma escolha razoável para os doentes críticos (99, 100). Yağcı *et al.* observaram que os níveis de EPO podem sofrer alterações nos doentes COVID-19 (63), apresentando uma redução significativa em doentes COVID-19 críticos, em comparação com doentes com doença ligeira e com indivíduos saudáveis. Além disso, verificou-se que os valores de EPO eram significativamente menores nos doentes que faleceram em comparação com os sobreviventes.

Hadadi *et al.* descreveram um caso clínico em que a rhEPO foi prescrita a um doente COVID-19 de 80 anos, para tratamento de uma anemia grave inicial (100), tendo observado uma resposta muito rápida, tanto na correção da anemia (de 67 g/L para 90 g/L), como no alívio dos sintomas da COVID-19.

São necessários mais estudos clínicos para determinar a dose ideal e eficácia do tratamento com rhEPO nestes doentes (99, 100). Além disso, existem algumas preocupações com o risco aumentado de eventos trombóticos, especialmente tromboembolismo venoso (99-102). A maioria dos relatos de complicações de trombose por uso de rhEPO foram descritos em doentes com cancro ou com insuficiência renal crónica com administração prolongada da medicação. De notar, ainda, que o risco de complicações trombóticas aumenta quando são usados agentes estimuladores da eritropoiese para atingir níveis de hemoglobina superiores a 120 g/L (99).

Os agentes estimuladores da eritropoiese poderão ser recomendados em doentes COVID-19, que recebem trombopprofilaxia, com hematócrito inferior a 30% e apenas por 3 a 5 dias, para prevenir possíveis eventos trombóticos (99, 101).

A EPO pode, portanto, ser considerada uma estratégia terapêutica adjuvante para a SDRA em doentes COVID-19. Quanto à eficácia da rhEPO contra a infeção por SARS-CoV-2, são necessários ensaios que avaliem esse efeito direto da EPO na COVID-19 (63, 99).

7.5 Transfusões de sangue

As transfusões de sangue são uma terapia estabelecida e rápida em doentes com anemia grave, em risco de vida, especialmente naqueles com patologias concomitantes, incluindo doenças hemorrágicas e anemia induzida por quimioterapia (45). Devido ao risco

aumentado de reações alérgicas, reações hemolíticas agudas e lesão pulmonar aguda, é recomendada uma estratégia restritiva de hemotransfusão para quase todas as patologias (45).

8 Conclusão

O SARS-CoV-2 é um vírus altamente contagioso e, apesar da maioria dos infectados apresentar sintomas ligeiros a moderados, 20% dos doentes progride para doença grave. A doença grave é caracterizada por hiperinflamação, em que a “tempestade” de citocinas causa danos em vários órgãos, principalmente nos pulmões, com lesões alveolares difusas que podem culminar na SDRA. As formas moderadas e graves da COVID-19 são frequentemente acompanhadas de alterações bioquímicas, imunológicas, hemostáticas e de alterações hematológicas, que podem ser usadas para a avaliação da gravidade da doença e a sua monitorização.

Os processos inflamatórios que ocorrem na COVID-19, como aumento da produção e ativação de leucócitos, aumento da produção de citocinas, interleucinas e metabolitos de oxigénio podem afetar o metabolismo do ferro, a eritropoiese e o tempo de vida dos eritrócitos. Em doentes COVID-19 existem evidências de alteração do metabolismo do ferro, com o aumento dos valores de ferritina e hepcidina, biomarcadores de fase aguda, e diminuição dos valores de ferro sérico, da saturação da transferrina, da capacidade total de fixação do ferro e da transferrina. Estas alterações são características da deficiência funcional em ferro, que se associa ao processo inflamatório, e que pode contribuir para o desenvolvimento da anemia da inflamação.

A anemia da inflamação, principalmente a forma ligeira, representa uma comorbilidade comum em doentes COVID-19, podendo estar presente em 15% a 61% dos doentes infectados pelo SARS-CoV-2. A anemia representa um fator de risco significativo para hospitalização e mortalidade, especialmente em doentes infectados pelo SARS-CoV-2 que apresentam outras comorbidades.

Alguns estudos reportaram uma associação significativa entre a existência de anemia e um maior tempo de hospitalização e aumento da admissão em UCI em doentes COVID-19. A mortalidade foi o parâmetro com resultados mais consensuais, em que a maioria dos estudos observaram que a existência de anemia aquando da admissão hospitalar de doentes COVID-19 está associada a uma mortalidade significativamente maior durante a hospitalização. Em concordância, os valores de Hb de doentes COVID-19 são significativamente mais baixos que em doentes não COVID. Existe também uma associação significativa entre os níveis de Hb e a gravidade da doença e mortalidade. Além

disso, a Hb destacou-se como um parâmetro promissor de prognóstico de gravidade mortalidade da doença COVID-19.

De facto, os resultados de diferentes estudos demonstram que a anemia, poderá ser incluída em algoritmos que avaliam a previsão de risco de mortalidade e gravidade na COVID-19, como o sistema *score* hemocitométrico de prognóstico da COVID-19 desenvolvido por Linssen *et al.* (77). Por outro lado, a anemia da inflamação nestes doentes poderá beneficiar de terapêuticas como a imunossupressão e o uso de rhEPO.

A identificação de doentes COVID-19 com anemia é importante na prática clínica, uma vez que contribuirá para identificar doentes de alto risco, que necessitam de priorização no tratamento e monitorização da doença e suas complicações.

9 Referências bibliográficas

1. Liu Y-C, Kuo R-L, Shih S-R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed J.* 2020; 43(4): 328-33.
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em <https://covid19.who.int/> [Acedido em 19/05/2022]
3. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(3): 325-28.
4. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1): 221-36.
5. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Si H-R, Guo H, Zhu Y, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270-73.
6. Florindo HF, Kleiner R, Vaskovich-Koubi D, Yeini E, Tiram G, Liubomirski Y, et al. Immune-mediated approaches against COVID-19. *Nat Nanotechnol.* 2020; 15(8): 630-45.
7. Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. *Postgrad Med J.* 2021; 97(1147): 312-20.
8. Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur Respir J.* 2020; 55(4): 1-3.
9. Darif D, Hammi I, Kihel A, Saik IEI, Guessous F, Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microb Pathog.* 2021; 153 1-10.
10. Organization WH. Clinical management of COVID-19. 2020.
11. Ochani RK, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, Batra S, et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez Med.* 2021; 29(1): 20-36.
12. Nile SH, Nile A, Qiu J, Li L, Jia X, Kai G. COVID-19: Pathogenesis, cytokine storm and therapeutic potential of interferons. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020; 53 66-70.

13. Overview of Testing for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19. Disponível em <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html> [Acedido em 20/02/2022]
14. Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021; 105(2): 441-55.
15. Taneri PE, Gómez-Ochoa SA, Llanaj E, Raguindin PF, Rojas LZ, Roa-Díaz ZM, et al. Anemia and iron metabolism in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2020; 35(8): 763-73.
16. Toledo SLdO, Nogueira LS, Carvalho MdG, Rios DRA, Pinheiro MdB. COVID-19: Review and hematologic impact. *Clin Chim Acta*. 2020; 510 170-76.
17. Zuin M, Rigatelli G, Quadretti L, Fogato L, Zuliani G, Roncon L. Prognostic Role of Anemia in COVID-19 Patients: A Meta-Analysis. *Infect Dis Rep*. 2021; 13(4): 930-37.
18. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 in patients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*. 2020; 146(1): 110-18.
19. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*. 2020; 323(20): 2052-59.
20. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia Ja, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020; 180(7): 934-43.
21. Bastin A, Shiri H, Zanganeh S, Fooladi S, Moghaddam MAM, Mehrabani M, et al. Iron Chelator or Iron Supplement Consumption in COVID-19? The Role of Iron with Severity Infection. *Biol Trace Elem Res*. 2021; 1-11.
22. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223): 507-13.
23. Henry BM, Oliveira MHSd, Benoit S, Plebania M, Lippia G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58(7): 1021-28.
24. Zhou C, Chen Y, Ji Y, He X, Xue D. Increased Serum Levels of Hepcidin and Ferritin Are Associated with Severity of COVID-19. *Med Sci Monit*. 2020; 26 1-7.
25. Wu J, Liu J, Zhao X, Liu C, Wang W, Wang D, et al. Clinical Characteristics of Imported Cases of COVID-19 in Jiangsu Province: A Multicenter Descriptive Study. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(15): 706-12.
26. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497-506.

27. Qian GQ, Yang NB, Ding F, Ma AHY, Wang ZY, Shen YF, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of 91 hospitalized patients with COVID-19 in Zhejiang, China: a retrospective, multi-centre case series. *QJM*. 2020; 113(7): 474-81.
28. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(15): 762–68.
29. Wang Z, Yang B, Li Q, Wen L, Zhang R. Clinical Features of 69 Cases with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(15): 769-77.
30. Song M, Graubard BI, Rabkin CS, Engels EA. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general population. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 464-72.
31. Pozdnyakova O, Connell NT, Battinelli EM, Connors JM, Fell G, Kim AS. Clinical Significance of CBC and WBC Morphology in the Diagnosis and Clinical Course of COVID-19 Infection. *Am J Clin Pathol* 2021; 155(3): 364-75.
32. Kaur G, Sandeep F, Olayinka O, Gupta G. Morphologic Changes in Circulating Blood Cells of COVID-19 Patients. *Cureus*. 2021; 13(2): 1-8.
33. Martens RJH, Adrichem AJv, Mattheij NJA, Brouwer CG, Twist DJLv, Broerse JJCR, et al. Hemocytometric characteristics of COVID-19 patients with and without cytokine storm syndrome on the sysmex XN-10 hematology analyzer. *Clin Chem Lab Med*. 2021; 59(4): 783-93.
34. Zini G, Bellesi S, Ramundo F, d'Onofrio G. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. *Am J Hematol*. 2020; 95(7): 870-72.
35. Sadigh S, Massoth LR, Christensen BB, Stefely JA, Keefe J, Sohani AR. Peripheral blood morphologic findings in patients with COVID-19. *Int J Lab Hematol*. 2020; 42(6): 248-51.
36. Pezeshki A, Vaezi A, Nematollahi P. Blood cell morphology and COVID-19 clinical course, severity, and outcome. *J Hematop*. 2021; 14(3): 221-28.
37. Huang Y, Tu M, Wang S, Chen S, Zhou W, Chen D, et al. Clinical characteristics of laboratory confirmed positive cases of SARS-CoV-2 infection in Wuhan, China: A retrospective single center analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020; 36(101606): 1-3.
38. Foy BH, Carlson JCT, Reinertsen E, Valls RPI, Lopez RP, Palanques-Tost E, et al. Association of Red Blood Cell Distribution Width With Mortality Risk in Hospitalized Adults With SARS-CoV-2 Infection. *JAMA Netw Open*. 2020; 3(9): 1-13.
39. Kubánková M, Hohberger B, Hoffmanns J, Fürst J, Herrmann M, Guck J, et al. Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophys J*. 2021; 120(14): 2838-47.
40. Takeshita S, Kakita H, Toriuchi K, Aoki H, Ueda H, Wakatsuki A, et al. Insufficient thrombopoietin due to hepatic dysmature results in thrombocytopenia in small-for-gestational-age rats. *Br J Haematol*. 2021; 192(4): 105-8.
41. Gerard D, Safa Ben Brahim, Lesesve JF, Perri J. Are mushroom-shaped erythrocytes an indicator of COVID-19? *Br J Haematol*. 2021; 192(2): 230.
42. Berzuini A, Bianco C, Migliorini AC, Valenti L, Prati D. Red blood cell morphology in patients with COVID-19-related anaemia. *Blood Transfus*. 2021; 19(1): 34-36.

43. Rocca DGD, Magnocavallo M, Lavalle C, Romero J, Forleo GB, Tarantino N, et al. Evidence of systemic endothelial injury and microthrombosis in hospitalized COVID-19 patients at different stages of the disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2021; 51(3): 571-76.
44. Schapkaite E, Jager TD, Levy B. The characteristic peripheral blood morphological features of hospitalized patients infected with COVID-19. *Int J Lab Hematol*. 2021; 43(3): 130-34.
45. Lanser L, Fuchs D, Kurz K, Weiss G. Physiology and Inflammation Driven Pathophysiology of Iron Homeostasis-Mechanistic Insights into Anemia of Inflammation and Its Treatment. *Nutrients*. 2021; 13(11): 1-29.
46. Ganz T. Anemia of Inflammation. *N Engl J Med*. 2019; 381(12): 1148-57.
47. Girelli D, Marchi G, Busti F, Vianello A. Iron metabolism in infections: Focus on COVID-19. *Semin Hematol*. 2021; 58(3): 182-87.
48. Drakesmith H, Prentice A. Viral infection and iron metabolism. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6(7): 541-52.
49. Kernan KF, Carcillo aJA. Hyperferritinemia and inflammation. *Int Immunol*. 2017; 29(9): 401-9.
50. Farid Y, Bowman NS, Lecat P. Biochemistry, Hemoglobin Synthesis. *StatPearls*; 2022.
51. Cassat JE, Skaar EP. Iron in Infection and Immunity. *Cell Host Microbe*. 2013; 13(5): 509-19.
52. Gafter-Gvili A, Schechter A, Rozen-Zvi B. Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Acta Haematol*. 2019; 142(1): 44-50.
53. Camaschella C. Iron deficiency. *Blood*. 2019; 133(1): 30-39.
54. Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol*. 2013; 161(5): 639-48.
55. Rapozzi V, Juarranz A, Habib A, Ihan A, Strgar R. Is haem the real target of COVID-19? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021; 35(102381): 1-4.
56. Shah A, Frost JN, Aaron L, Donovan K, Drakesmith H. Systemic hypoferrremia and severity of hypoxemic respiratory failure in COVID-19. *Crit Care*. 2020; 24(320): 1-4.
57. Claise C, Saleh J, Rezek M, Vaulont S, Peyssonnaud C, Edeas M. Low transferrin levels predict heightened inflammation in patients with COVID-19: New insights. *Int J Infect Dis*. 2022; 116 74-79.
58. Ehsani S. COVID-19 and iron dysregulation: distant sequence similarity between hepcidin and the novel coronavirus spike glycoprotein. *Biol Direct*. 2020; 15(1): 1-13.
59. Li R, Luo C, Mines M, Zhang J, Fan G-H. Chemokine CXCL12 induces binding of ferritin heavy chain to the chemokine receptor CXCR4, alters CXCR4 signaling, and induces phosphorylation and nuclear translocation of ferritin heavy chain. *J Biol Chem*. 2006; 281(49): 37616-27.
60. Gray CP, Arosio P, Hersey P. Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. *Blood*. 2002; 99(9): 3326-34.

61. Edeas M, Saleh J, Peyssonnaud C. Iron: Innocent bystander or vicious culprit in COVID-19 pathogenesis? *Int J Infect Dis.* 2020; 97 303-5.
62. Lam LKM, Murphy S, Kokkinaki D, Venosa A, Sherrill-Mix S, Casu C, et al. DNA binding to TLR9 expressed by red blood cells promotes innate immune activation and anemia. *Sci Transl Med.* 2021; 13(616): 1-34.
63. Yağcı S, Serin E, Acicbe Ö, Zeren Mİ, Odabaşı MS. The relationship between serum erythropoietin, hepcidin, and haptoglobin levels with disease severity and other biochemical values in patients with COVID-19. *Int J Lab Hematol.* 2021; 43(1): 142-51.
64. Mendonça MM, Cruz KRd, Pinheiro DdS, Moraes GCA, Ferreira PM, Ferreira-Neto ML, et al. Dysregulation in erythrocyte dynamics caused by SARS-CoV-2 infection: possible role in shuffling the homeostatic puzzle during COVID-19. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022; 44(2): 235-45.
65. Thomas T, Stefanoni D, Dzieciatkowska M, Issaian A, Nemkov T, Hill RC, et al. Evidence of Structural Protein Damage and Membrane Lipid Remodeling in Red Blood Cells from COVID-19 Patients. *J Proteome Res.* 2020; 19(11): 4455-69.
66. Lanser L, Burkert FR, Bellmann-Weiler R, Schroll A, Wildner S, Fritsche G, et al. Dynamics in Anemia Development and Dysregulation of Iron Homeostasis in Hospitalized Patients with COVID-19. *Metabolites.* 2021; 11(10): 1-11.
67. Tao Z, Xu J, Chen W, Yang Z, Xu X, Liu L, et al. Anemia is associated with severe illness in COVID-19: A retrospective cohort study. *J Med Virol.* 2021; 93(3): 1478-88.
68. Chen C, Zhou W, Fan W, Ning X, Yang S, Lei Z, et al. Association of anemia and COVID-19 in hospitalized patients. *Future Virol.* 2021; 16(7): 1-8.
69. Tremblay D, Rapp JL, Alpert N, Lieberman-Cribbin W, Mascarenhas J, Taioli E, et al. Mild anemia as a single independent predictor of mortality in patients with COVID-19. *EJHaem.* 2021; 2(3): 319-26.
70. Dinevari MF, Somi MH, Majd ES, Farhangi MA, Nikniaz Z. Anemia predicts poor outcomes of COVID-19 in hospitalized patients: a prospective study in Iran. *BMC Infect Dis.* 2021; 21(170): 1-7.
71. Elkhailifa AME, Elderderiy AY, Bataj bAA, Tamomh AG, Alyami MM, Almakrami HA, et al. Hematological Findings among COVID-19 Patients Attending King Khalid Hospital at Najran, Kingdom of Saudi Arabia. *Biomed Res Int.* 2022; 2022(4620037): 1-6.
72. Giacomelli A, Ridolfo AL, Milazzo L, Oreni L, Bernacchia D, Siano M, et al. 30-day mortality in patients hospitalized with COVID-19 during the first wave of the Italian epidemic: A prospective cohort study. *Pharmacol Res.* 2020; 158(104931): 1-7.
73. Bergamaschi G, Andreis FBd, Aronico N, Lenti MV, Barteselli C, Merli S, et al. Anemia in patients with Covid-19: pathogenesis and clinical significance. *Clin Exp Med.* 2021; 21(2): 239-46.
74. Oh SM, Skendelas JP, Macdonald E, Bergamini M, Goel S, Choi J, et al. On-admission anemia predicts mortality in COVID-19 patients: A single center, retrospective cohort study. *Am J Emerg Med.* 2021; 48 140-47.

75. Bellmann-Weiler R, Lanser L, Barket R, Rangger L, Schapfl A, Schaber M, et al. Prevalence and Predictive Value of Anemia and Dysregulated Iron Homeostasis in Patients with COVID-19 Infection. *J Clin Med*. 2020; 9(8): 1-11.
76. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395(10229): 1054-62.
77. Linssen J, Ermens A, Berrevoets M, Seghezzi M, Previtali G, Brugge SvdS-vd, et al. A novel haemocytometric COVID-19 prognostic score developed and validated in an observational multicentre European hospital-based study. *eLife*. 2020; 9 1-28.
78. Sonnweber T, Boehm A, Sahanic S, Pizzini A, Aichner M, Sonnweber B, et al. Persisting alterations of iron homeostasis in COVID-19 are associated with non-resolving lung pathologies and poor patients' performance: a prospective observational cohort study. *Respir Res*. 2020; 21(276): 1-9.
79. Omrani-Nava V, Maleki I, Ahmadi A, Moosazadeh M, Hedayatizadeh-Omran A, Roozbeh F, et al. Evaluation of Hepatic Enzymes Changes and Association with Prognosis in COVID-19 Patients. *Hepat Mon*. 2020; 20(4): 1-6.
80. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood*. 2019; 133(1): 40-50.
81. Cen Y, Chen X, Shen Y, Zhang XH, Lei Y, Xu C, et al. Risk factors for disease progression in patients with mild to moderate coronavirus disease 2019-a multi-centre observational study. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26(9): 1242-47.
82. El-Lateef AEA, Ismail MM, Thabet G, Cabrido N-A. Complete blood cells count abnormalities in COVID-19 patients and their prognostic significance: Single center study in Makkah, Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2022; 43(6): 572-78.
83. Wang C, Deng R, Gou L, Fu Z, Zhang X, Shao F, et al. Preliminary study to identify severe from moderate cases of COVID-19 using combined hematology parameters. *Ann Transl Med*. 2020; 8(9): 1-15.
84. Yousif MYE, Haroun MMFAEMS, Ahmed KAHM, Amir O, Alfatih M, Shiekh AKATA, et al. Clinical Characteristics and Risk Factors Associated with Severe Disease Progression among COVID-19 Patients In Wad Medani Isolation Centers: A Multicenter Retrospective Cross-Sectional Study. *Health Sci Rep*. 2022; 5(2): 1-11.
85. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020; 382(18): 1708-20.
86. Fan BE, Chong VCL, Chan SSW, Lim GH, Lim KGE, Tan GB, et al. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am J Hematol*. 2020; 95(6): 131-34.
87. Chen T, Wu D, Chen H, Yan W, Yang D, Chen G, et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ*. 2020; 368 1-12.

88. Al-Jarallah M, Rajan R, Saber AA, Pan J, Al-Sultan AT, Abdelnaby H, et al. In-hospital mortality in SARS-CoV-2 stratified by hemoglobin levels: A retrospective study. *EJHaem*. 2021; 2(3): 335–39.
89. Yi Y, Lagniton PNP, Ye S, Li E, Xu R-H. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci*. 2020; 16(10): 1753-66.
90. Russell CD, Millar JE, Baillie JK. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet*. 2020; 395(10223): 514-23.
91. Shang L, Zhao J, Hu Y, Du R, Cao B. On the use of corticosteroids for 2019-nCoV pneumonia. *Lancet*. 2020; 395(10225): 683-84.
92. Gavriatopoulou M, Ntanasis-Stathopoulos I, Korompoki E, Fotiou D, Migkou M, Tzanninis IG, et al. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. *Clin Exp Med*. 2021; 21(2): 167-79.
93. Salama C, Han J, Yau L, Reiss WG, Kramer B, Neidhart JD, et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med*. 2021; 384(1): 20-30.
94. Somers EC, Eschenauer GA, Troost JP, Golob JL, Gandhi TN, Wang L, et al. Tocilizumab for Treatment of Mechanically Ventilated Patients With COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2021; 73(2): 445-54.
95. Madu AJ, Ughasoro MD. Anaemia of Chronic Disease: An In-Depth Review. *Med Princ Pract*. 2017; 26(1): 1-9.
96. Cavezzi A, Troiani E, Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin Pract*. 2020; 10(2): 24-30.
97. Naseef PP, Elayadeth-Meethal M, Salim KTM, Anjana A, Muhas C, Vajid KA, et al. Therapeutic potential of induced iron depletion using iron chelators in Covid-19. *Saudi J Biol Sci*. 2022; 29(4): 1947-56.
98. Dalamaga M, Karampela I, Mantzoros CS. Commentary: Could iron chelators prove to be useful as an adjunct to COVID-19 Treatment Regimens? *Metabolism*. 2020; 108 1-3.
99. Sahebnaasagh A, Mojtahedzadeh M, Najmeddin F, Najafi A, Safdari M, Ghaleno HR, et al. A Perspective on Erythropoietin as a Potential Adjuvant Therapy for Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Patients with COVID-19. *Arch Med Res*. 2020; 51(7): 631-35.
100. Hadadi A, Mortezaazadeh M, Kolahehdouzan K, Alavian G. Does recombinant human erythropoietin administration in critically ill COVID-19 patients have miraculous therapeutic effects? *J Med Virol*. 2020; 92(7): 915-18.
101. Soliz J, Schneider-Gasser EM, Arias-Reyes C, Aliaga-Raduan F, Poma-Machicao L, Zubieta-Calleja G, et al. Coping with hypoxemia: Could erythropoietin (EPO) be an adjuvant treatment of COVID-19? *Respir Physiol Neurobiol*. 2020; 279 1-8.
102. Fishbane S, Hirsch JS. Erythropoiesis-Stimulating Agent Treatment in Patients With COVID-19. *Am J Kidney Dis*. 2020; 76(3): 303-5.

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório Final do Estágio Profissional

Raquel Oliveira Machado

M
2022



Relatório de estágio do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao
Grau de Mestre em Análises Clínicas

Relatório Final do Estágio Profissional

Trabalho realizado sob a orientação de:

Dra. Sofia Botelho Moniz

Unilabs Porto Central

Raquel Oliveira Machado

Julho de 2022

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTE RELATÓRIO DE ESTÁGIO.

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Sofia Botelho Moniz pela orientação e aos restantes colaboradores da Unilabs pela disponibilidade e apoio durante o estágio no laboratório e na realização deste relatório.

Agradeço também aos colegas do mestrado pelo suporte sempre presente durante o curso, e à família e amigos por me acompanharem e apoiarem nesta etapa tão importante.

Resumo

Este relatório documenta as atividades do estágio profissional do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. O estágio decorreu no Laboratório Central de Análises Clínicas do Porto da Unilabs (Unilabs Porto Central), iniciou-se a 24 de Janeiro e finalizou a 8 de Abril de 2022, com uma duração de 450 horas.

O estágio e o presente relatório têm como objetivos a execução e validação de técnicas laboratoriais num contexto de um laboratório de análises clínicas, a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos, a integração no meio profissional e a elaboração de um relatório de atividades.

No decorrer do estágio, houve passagem pelas diferentes valências de um laboratório de análises clínicas, incluindo a fase pré-analítica, a fase analítica na área da Bioquímica, Imunologia, Imuno-hematoterapia, Hematologia e Microbiologia e, em menor grau, a fase pós-analítica com a validação de resultados.

Em todos os setores do laboratório foi possível visualizar e/ou aplicar os princípios básicos dos métodos analíticos de vários analisadores e também processos da rotina laboratorial, incluindo a manutenção dos analisadores e a programação de controlos, calibradores e amostras. Foi também possível evidenciar o papel fundamental das análises clínicas na prevenção, diagnóstico e monitorização de doença.

Neste relatório são descritas análises, métodos e instrumentos analíticos usados nos diversos setores durante o estágio, com um maior foco nas análises bioquímicas e de bacteriologia, e também as atividades realizadas como estagiária no laboratório.

Abstract

This report documents the activities carried out in the professional internship of the Master's degree in Clinical Analysis at Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. The internship took place at Unilabs Porto Central, started on January 24 and ended on April 8, 2022, with a duration of 450 hours.

The purpose of this report is the application and validation of laboratory techniques in the context of a clinical laboratory, the consolidation of the academic knowledge acquired during the degree, the integration in a professional environment and the elaboration of an activity report.

During the internship, the different valences of a clinical laboratory were experienced, including the pre-analytical phase, the analytical phase in Biochemistry, Immunology, Immunohematotherapy, Hematology and Microbiology and, to a lesser extent, the post-analytical phase with validation of results.

It was possible to visualize and apply the basic principles of the analytical methods of various analyzers and laboratory routine processes in all the laboratory sectors, including the maintenance of analyzers and programming of controls, calibrators, and samples. It was also possible to highlight the role of clinical laboratory tests in the prevention, diagnosis, and monitoring of disease.

In this report, the laboratory tests, methods, and analytical instruments present in the different sectors are described, with a bigger focus on the Biochemistry and Microbiology, and also the activities carried out as an intern in the laboratory.

Índice

Relatório de Estágio

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas	xii
Lista de abreviaturas e símbolos	xiv
1 Introdução	1
2 Caracterização do Laboratório	1
3 Controlo de Qualidade	2
4 Pré-analítica.....	3
4.1 Triagem (Soro, Plasma, Sangue total)	3
4.1.1 AutoMate 2500®	4
4.2 Triagem (Urinas, Fezes).....	4
5 Bioquímica	5
5.1 Setor Core.....	5
5.1.1 Aptio® Automation	6
5.1.2 Atellica® CH 930 Analyzer	6
5.1.3 Espectrofotometria.....	7
5.1.4 Turbidimetria e Nefelometria	8
5.1.5 Potenciometria.....	8
5.1.6 Atellica® IM 1600 Analyzer	9
5.1.7 Quimioluminescência	9
5.1.8 Imunoensaios.....	10
5.1.9 CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING	11
5.1.10 Eletroforese e densitometria	12
5.2 Setor Análises Especiais.....	12

5.2.1	API 5000®	13
5.2.2	PlasmaQuant MS	13
5.2.3	Espectrometria de massa	14
5.2.4	Nexera HPLC	15
5.2.5	Cromatografia	15
5.3	Análises de Bioquímica Clínica	16
5.3.1	Metabolismo de hidratos de carbono e diabetes	16
5.3.2	Metabolismo de lípidos e dislipidemias	17
5.3.3	Ionograma	18
5.3.4	Função renal	18
5.3.5	Função hepatobiliar	19
5.3.6	Função pancreática	20
5.3.7	Função da tiroide	20
5.3.8	Marcadores cardíacos	21
5.3.9	Metabolismo ósseo	22
5.3.10	Metabolismo do ferro, anemia ferripriva e megaloblástica	22
5.3.11	Vitaminas e elementos vestigiais	23
5.3.12	Marcadores tumorais e catecolaminas	24
5.3.13	Endocrinologia reprodutiva	25
5.3.14	Monitorização de fármacos e drogas de abuso	26
5.3.15	Pesquisa de sangue oculto	26
6	Imunologia	27
6.1	Eletroimunofixação	28
6.2	Reações de hipersensibilidade	28
6.2.1	Intolerância alimentar	28
6.3	Autoimunidade	29
6.3.1	Anticorpos antinucleares	29
6.3.2	AMA, ASMA, AGPA e LMK	31
7	Imuno-hematoterapia	31

7.1	Grupos sanguíneos.....	32
7.2	Prova de <i>Coombs</i>	33
7.3	Transfusões	33
8	Hematologia.....	33
8.1	Hemograma	34
8.1.1	XN Series.....	35
8.1.2	Citometria de fluxo	36
8.1.3	Impedância	37
8.1.4	SP-50 e CellaVision® DM96	37
8.2	Velocidade de sedimentação	37
9	Microbiologia.....	38
9.1	Exame cultural	39
9.2	Coloração de Gram.....	39
9.3	Coloração de Ziehl-Neelsen.....	40
9.4	Identificação.....	40
9.4.1	MALDI-TOF.....	40
9.5	Antibiogramas	41
9.6	Infeções bacteriológicas e meios de cultura	42
9.6.1	Infeções do trato respiratório inferior.....	42
9.6.2	Gelose sangue.....	43
9.6.3	Gelose chocolate	44
9.6.4	MacConkey	44
9.6.5	Infeções do trato urinário.....	44
9.6.6	CLED	45
9.6.7	Infeções genitais	46
9.6.8	Infeções gastrointestinais.....	47
9.6.9	Meio XLD	47
9.6.10	Meio CAMPY	48
9.6.11	Outros produtos	48

9.6.12	MSA.....	49
9.7	Micologia.....	50
9.8	Parasitologia	50
9.9	Virologia.....	50
10	Urina tipo II	51
10.1	Análise química da urina.....	51
10.2	Sedimento urinário	52
11	Conclusão	53
12	Referência bibliográficas.....	54

Índice de figuras

Figura 1. Sistema automático de processamento de amostras AutoMate 2500® Family Sample Processing Systems da Beckman Coulter (8).	4
Figura 2. Linha de trabalho com diferentes módulos pré-analíticos e pós-analíticos Aptio® Automation da Siemens Healthineers (10).	6
Figura 3. Autoanalisador de testes fotométricos e potenciometria Atellica® CH 930 Analyzer da Siemens Healthineers (12).	7
Figura 4. Componentes de um espectrofotômetro de feixe único (3).	7
Figura 5. Arranjo ótico da turbidimetria e da nefelometria (3).	8
Figura 6. Configuração de um ISE (13).	9
Figura 7. Autoanalisador de imunoenaios por quimioluminescência Atellica® IM 1600 Analyzer da Siemens Healthineers (12).	9
Figura 8. Funcionamento de um fotomultiplicador (14).	10
Figura 9. Imunoensaio competitivo. Adaptado de Dasgupta et al. (2).	10
Figura 10. Imunoensaio em formato sandwich. Adaptado de Dasgupta et al. (2).	11
Figura 11. Sistema de eletroforese capilar CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING da Sebia (15).	11
Figura 12. Sistema de eletroforese capilar (3).	12
Figura 13. Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem API 5000® da AB SCIEX (16).	13
Figura 14. Espectrômetro de massa por plasma indutivamente acoplado PlasmaQuant MS Elite da Analytik Jena (17).	13
Figura 15. Componentes de um espectrômetro de massa e o espectro de massa resultante dos compostos presentes em solução (18).	14
Figura 16. Sistema cromatografia líquida de alta eficiência Nexera 40 Series da Shimadzu (19).	15
Figura 17. Componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (3).	16
Figura 18. Imunoglobulinas monoclonais (Ig) demonstradas por imunofixação sérica. Adaptado de Richard et al. (3).	28
Figura 19. Analisador de ImunoBlots EUROBlotOne da EUROIMMUN (29).	29
Figura 20. Padrões de fluorescência de ANA (Antinuclear Antibodies) num ensaio IFI (Imunofluorescência Indireta) com células Hep-2 (30).	30
Figura 21. Analisador de ensaios de IFI (Imunofluorescência Indireta) Zenit PRO da A. Menarini Diagnostics (32).	30

Figura 22. Analisador de ensaios FEIA (Fluoroenzyme Immunoassay) ImmunoCAP® 250 da ThermoFisher Scientific (33).....	31
Figura 23. Analisador automático de testes imunohematológicos ORTHO AutoVue® Innova System através de cassetes ORTHO BioVue® da Ortho Clinical Diagnostics (35).....	32
Figura 24. Analisador de parâmetros hematológicos por citometria de fluxo de fluorescência e impedância por focalização hidrodinâmica XN-1000 Pure da Sysmex Europe (36).	35
Figura 25. Componentes do um citômetro de fluxo (3).....	36
Figura 26. Sistema digital de morfologia celular CellaVision® DM96 da Siemens Healthineers (37).....	37
Figura 27. Instrumento CUBE 30 touch da Diesse para a determinação da velocidade de sedimentação (39).	38
Figura 28. Bacilos ácido-resistentes corados com coloração de Ziehl-Neelsen (41).....	40
Figura 29. Sistema MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) microflex® da Bruker (42).....	41
Figura 30. Sistema MicroScan WalkAway 96 plus da Beckman Coulter para a realização de antibiogramas (43).....	42
Figura 31. β-hemólise por <i>Streptococcus pyogenes</i> em meio gelose sangue (esquerda); α-hemólise por <i>Streptococcus mitis</i> em meio gelose sangue (direita). Adaptado de Murray et al. (40).	43
Figura 32. Meio de MacConkey (45).....	44
Figura 33. Meio CLED com crescimento bacteriano de um organismo fermentador de lactose (47).....	46
Figura 34. Meio chromID® Strepto B para rastreio de <i>Streptococcus</i> do grupo B (51).....	47
Figura 35. Meio XLD (52).....	48
Figura 36. Colônias amarelas de <i>S. aureus</i> em MSA (Mannitol Salt Agar) (53).....	50
Figura 37. Analisador automatizado de análise química de urina UC-3500 da Sysmex Europe (54).	52
Figura 38. Citômetro de fluxo UF-5000 da Sysmex Europe (55).....	52
Figura 39. Dispositivo de imagem digital de partículas de urina totalmente automatizado UD-10 da Sysmex Europe (56).....	53

Índice de tabelas

Tabela 1. Parâmetros usados no diagnóstico de diabetes e valores patológicos definidos na Norma da DGS Nº 002/2011; métodos e instrumentos analíticos usados para a medição dos respetivos parâmetros no laboratório.	17
Tabela 2. Parâmetros de diagnóstico de dislipidemias segundo a Norma da DGS Nº 066/2011; Métodos e instrumentos analíticos usados no laboratório para a medição dos respetivos parâmetros.	17
Tabela 3. Método e instrumento analítico usados para o doseamento do sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-).	18
Tabela 4. Parâmetros de avaliação da função renal e respetivos métodos e instrumentos analíticos com que são doseados.	19
Tabela 5. Parâmetros de avaliação da função e lesão hepática e respetivo método e instrumento analítico de medição.	20
Tabela 6. Enzimas usadas na avaliação da função pancreática e respetivo método e instrumento analítico usados na sua medição.	20
Tabela 7. Parâmetros de avaliação da função da tiroide e respetivos método e instrumento analítico de medição.	21
Tabela 8. Marcadores cardíacos usados na avaliação da necrose e estresse miocárdicos e respetivos métodos e instrumentos analíticos usados no seu doseamento.	21
Tabela 9. Parâmetros usados no estudo do metabolismo ósseo e respetivos métodos e instrumentos analíticos usados na medição destes parâmetros.	22
Tabela 10. Parâmetros de avaliação do metabolismo do ferro e respetivos métodos e instrumentos analíticos com que são medidos.	23
Tabela 11. Método e instrumento analítico usados para o doseamento de folato e vitamina B12.	23
Tabela 12. Vitaminas doseadas no laboratórios e métodos e instrumentos analíticos usados para o doseamento das vitaminas e dos elementos vestigiais.	24
Tabela 13. Marcadores tumorais e o seu uso clínico; instrumento e método analítico com que os marcadores tumorais são doseados.	24
Tabela 14. Hormonas usadas na avaliação da função reprodutiva e gravidez. Métodos e instrumentos analíticos usados para o doseamento das respetivas hormonas.	25
Tabela 15. Monitorização de fármacos e drogas de abuso e respetivos métodos e instrumentos analíticos pelos quais são doseados no laboratório.	26
Tabela 16. Parâmetros de avaliação da inflamação e respetivos métodos e instrumentos analíticos com que são doseados.	27

Tabela 17. Sistema ABO e sistema Rh. Antígenos presentes na superfície dos eritrócitos e anticorpos presentes no plasma de cada grupo dos sistemas.....	32
Tabela 18. Parâmetros eritrocitários presentes no hemograma e respetiva definição e interpretação clínica.....	34
Tabela 19. Parâmetros leucocitários e plaquetários presentes no hemograma.....	35
Tabela 20. Locais afetados pela infeção do trato respiratório inferior e exemplos de bactérias responsáveis pela infeção.	43
Tabela 21. Principais bactérias responsáveis por infeções do trato urinário e suas características microscópicas (coloração de Gram) e macroscópicas (aparência em meio CLED).	45
Tabela 22. Diferentes produtos biológicos analisados na microbiologia e respetivos método de exame direto e meios de cultura.	49
Tabela 23. Marcadores serológicos virais e respetivo instrumento analítico.....	51

Lista de abreviaturas e símbolos

AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AFP	Alfa-fetoproteína
AGPA	<i>Anti-gastric Parietal Cell Antibodies</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AMA	<i>Anti-Mitochondrial Antibodies</i>
ANA	<i>Antinuclear Antibodies</i>
Apo B	Apolipoproteína B
ASMA	<i>Anti-Smooth Muscle Antibodies</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
BNP	<i>B-type Natriuretic Peptide</i>
Ca	Cálcio
CA	<i>Cancer Antigen</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CHGM	Concentração da Hemoglobina Globular Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CK	<i>Creatine Kinase</i>
CKMB	Creatina Cinase do Tecido Cardíaco
Cl	Cloreto
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>
CNA	<i>Columbia NaladixicAcid Agar</i>
CTFF	Capacidade Total de Fixação de Ferro

CV	Cardiovascular
DGS	Direcção-Geral da Saúde
DHEA	<i>Dehydroepiandrosterone</i>
DM	Diabetes mellitus
DM	<i>Decapping Module</i>
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
Fe	Ferro
FEIA	<i>Fluoroenzyme Immunoassay</i>
FIT	<i>Fecal Immunochemical Test</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
GC	Cromatografia Gasosa
GGT	Gama-Glutamil Transpeptidase
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina Glicada A1c
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HGM	Hemoglobina Globular Média
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IMT	<i>Integrated Multisensor Technology</i>

IOM	<i>Input/Output Module</i>
IPST	Instituto Português do Sangue e da Transplantação
ISE	<i>Ion-Selective Electrodes</i>
K	Potássio
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometry</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LKM	<i>Anti-Liver/Kidney/Microssomal Antibodies</i>
Lp (a)	Lipoproteína (a)
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>
Mg	Magnésio
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSA	<i>Mannitol Salt Agar</i>
Na	Sódio
NT-proBNP	<i>N-Terminal Pro-B-type Natriuretic Peptide</i>
P	Fósforo
PCR	Proteína C-reativa
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i>
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>

RIM	<i>Rack Input Module</i>
RIQAS	<i>Randox Internantional Quality Assessment Scheme</i>
SRM	<i>Storage Retrieval and Disposal Module</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
sTfR	<i>Soluble Transferrin Receptor</i>
SVD	<i>Sample-Volume Detection</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TnIH	<i>High-Sensitivity Troponin I</i>
TSH	<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
TSM	<i>Tube Sealer Module</i>
UK NEQAS	<i>United Kingdom National External Quality</i>
VGM	Volume Globular Médio
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VS	Velocidade de Sedimentação
XLD	<i>Xylose-Lysine Deoxycholate</i>

1 Introdução

As análises clínicas desempenham um papel fundamental nos cuidados de saúde. Um laboratório de análises clínicas fornece aos médicos e outros profissionais de saúde informações que auxiliam na prevenção, diagnóstico e monitorização de doença.

O estágio profissional do Mestrado em Análises Clínicas tem como principal objetivo proporcionar uma formação robusta e atual nas diversas áreas de um laboratório de análises clínicas, com a execução e validação de técnicas laboratoriais num contexto profissional. O estágio tem também como objetivos a consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo do período letivo do curso e a integração no meio profissional. O relatório de estágio permite adquirir as competências necessárias para a elaboração de um relatório de atividades.

O estágio decorreu no Laboratório Central de Análises Clínicas do Porto da Unilabs (Unilabs Porto Central), iniciou-se a 24 de Janeiro e finalizou a 8 de Abril de 2022, com uma duração de 450 horas. Houve passagem pelas diversas valências de um laboratório de análises clínicas: Hematologia, Bioquímica, Microbiologia, Imunologia e outras áreas presentes no laboratório; para além da componente analítica, a componente pré-analítica também esteve presente no estágio com a passagem pelo setor de Triagem.

Nos diferentes setores do laboratório foi possível compreender e aplicar os princípios básicos dos métodos analíticos dos diferentes analisadores e executar processos da rotina laboratorial como a manutenção diária e semanal dos analisadores e a programação de controlos, calibradores e amostras.

Neste relatório são abordadas as diversas análises, métodos e instrumentos analíticos usados nos diversos setores, com maior foco nas análises bioquímicas e de bacteriologia.

2 Caracterização do Laboratório

O laboratório Unilabs Porto Central localiza-se na Zona Industrial do Porto e iniciou atividade no segundo semestre de 2019. A Unilabs possui, atualmente, 10 laboratórios de diagnóstico em Portugal, mais de 900 unidades de colheita e um portfólio com mais de 2000 análises disponíveis.

O laboratório está dividido em vários setores: Pré-analítico, Core, Hematologia, Coagulação e Imuno-hematoterapia no piso 0, Microbiologia e Análises Especiais no piso 3. Para além destes setores há também uma secção pós-analítica com a validação de resultados por médicos, cujos gabinetes se encontram no piso 3. Existe um serviço de atendimento ao público com uma área de receção e um posto de colheita.

O Unilabs Porto Central tem um horário de atendimento das 8:00 horas às 13:00 horas em dias úteis (8:00 horas às 11:30 aos Sábados). O laboratório possui serviço de urgência e encontra-se operacional 24 horas por dia, 7 dias por semana.

O software utilizado pelo laboratório é o CLINIdATA®, este serviço web permite um acesso rápido ao circuito laboratorial desde a receção à disponibilização dos resultados. Outros programas utilizados regularmente pelo laboratório incluem InnovWay®, LabWay-LIMS® e Unity Real Time® para a gestão dos vários componentes do laboratório e controlo de qualidade.

3 Controlo de Qualidade

Os testes laboratoriais em análises clínicas têm como objetivo avaliar a condição fisiopatológica de um paciente para auxiliar no diagnóstico, prevenção e monitorização de doença. O controlo de qualidade é um dos parâmetros mais importantes nos laboratórios clínicos e tem como objetivo garantir a precisão e exatidão dos resultados das amostras dos pacientes.

O controlo da qualidade interno é um conjunto de procedimentos diários estipulados pelo laboratório que permitem um controlo da qualidade dos resultados dos exames laboratoriais ao longo de todo o processo analítico (fases pré-analítica, analítica e pós-analítica) (1).

Um controlo é definido como um material que contém o analito de interesse com uma concentração conhecida. Normalmente, controlos de valores baixos, médios e altos de um analito são usados para avaliar a precisão do método. A maioria dos materiais de controlo comercialmente disponíveis estão liofilizados e devem ser reconstituídos seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante (2).

O gráfico de *Levey-Jennings* é a representação gráfica mais comumente usada para avaliar os resultados do controlo de qualidade. Este formato mostra cada resultado sequencialmente ao longo do tempo e permite uma avaliação do desempenho do método. O valor da média representa o valor esperado e os limites desvio-padrão representam a imprecisão do método. As regras de *Westgard* são as regras de controlo de qualidade aplicadas na rejeição ou aceitação de uma corrida analítica (3, 4).

A avaliação externa da qualidade (AEQ) avalia o desempenho analítico de um laboratório em comparação com outros laboratórios que utilizam os mesmos métodos e instrumentos. A AEQ mede a exatidão de um laboratório usando amostras com valores analíticos não fornecidos que são analisadas como se fossem amostras de pacientes. Os resultados são devolvidos ao organizador para análise estatística. Os laboratórios recebem um relatório que compara o seu desempenho individual com outros laboratórios integrantes

do programa (5, 6). O laboratório Unilabs Porto Central é integrante de programas de AEQ internacionais como o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*) e o UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*).

A calibração é necessária para todos os instrumentos analíticos presentes num laboratório clínico. Os calibradores são materiais que contêm quantidades conhecidas do analito de interesse. Para um único ensaio, são necessários pelo menos dois calibradores, um calibrador que não contém analito e um calibrador com uma concentração de limite superior do analito. A curva de calibração é a representação gráfica do sinal instrumental em função da concentração, obtém-se através da medição dos calibradores e permite determinar a concentração das amostras (2).

4 Pré-analítica

A fase pré-analítica abrange todos os procedimentos antes da análise laboratorial, desde a preparação do doente à triagem das amostras. A maioria dos erros detetados num laboratório de análises clínicas têm origem na fase pré-analítica (7). Situações como uma colheita inadequada podem levar à necessidade de um pedido de nova colheita que implica custos e perda de tempo, ou causar uma interpretação incompleta ou incorreta dos resultados da análise.

Na pré-analítica é necessário ter em atenção diversos parâmetros que podem levar a um comprometimento do teste analítico, tais como: identificação incorreta da amostra; volume de amostra insuficiente; tubo de colheita inadequado e extravasamento da amostra durante transporte.

Os postos de colheita dão entrada da maioria das amostras no sistema informático antes destas serem transportadas para o laboratório central. É necessário dar entrada de algumas amostras, principalmente amostras de soro e plasma que têm origem em diferentes distritos como Faro e Lisboa e algumas amostras de urina e fezes.

A pré-analítica está dividida em duas zonas de triagem, uma zona onde são triados os tubos de soro, plasma e sangue total e uma outra onde são triadas as amostras de urina e fezes.

4.1 Triagem (Soro, Plasma, Sangue total)

Neste setor de triagem tive a oportunidade de participar em todas as fases de triagem durante uma semana (cerca de 40 horas) incluindo a centrifugação dos tubos, verificação da qualidade das amostras, separação dos tubos pelos respetivos setores e arquivo de amostras.

Na fase pré-analítica há necessidade de centrifugação de uma grande quantidade de tubos, nomeadamente: tubos com gel separador e tubos de citrato de sódio. Após a centrifugação dos tubos é necessário enviá-los para os respetivos locais de análise ou preparação. Os tubos mais comuns são: tubos de EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*), tubos de citrato de sódio e tubos com gel separador.

4.1.1 AutoMate 2500®

Cerca de metade dos tubos recebidos no setor da triagem são direcionados para o AutoMate 2500® (Figura 1), um sistema automático de processamento de amostras.



Figura 1. Sistema automático de processamento de amostras AutoMate 2500® Family Sample Processing Systems da Beckman Coulter (8).

4.2 Triagem (Urinas, Fezes)

Assim como no setor de triagem referido anteriormente, neste setor participei durante uma semana em todas as etapas que ocorrem na triagem de amostras de urinas ocasionais e fezes, especialmente na verificação da qualidade da amostra e separação da amostra para os tubos adequados para a realização das análises.

A maior parte das amostras de urina ocasional são triadas nos postos de colheita e fazem-se acompanhar dos respetivos tubos para os quais a urina foi separada. Algumas urinas são triadas neste setor, procede-se à etiquetagem e separação de urina para tubos BD Vacutainer® Plus. Antes da divisão, é necessário verificar o volume da amostra e se ocorreu extravasamento durante o transporte. A urina vem geralmente em frascos com um sistema de vácuo.

A urina é separada consoante as análises pedidas, sendo mais comumente dividida em: exame sumário (urina tipo 2), bacteriologia e bioquímica. Existem outras análises mais específicas que requerem um tubo para a análise pedida e outro tubo para armazenamento – urinoteca (e.g. proteinograma).

As amostras de fezes são maioritariamente amostras de 3 dias e as análises mais comuns são pesquisa de sangue oculto e exame parasitológico.

5 Bioquímica

A área da bioquímica clínica avalia o estado funcional de órgãos e vias metabólicas através de diversos parâmetros bioquímicos. Estes parâmetros são avaliados com recurso a técnicas de espectrofotometria, turbidimetria, potenciometria e quimioluminescência, assim como, eletroforese, espectrometria de massa e cromatografia.

As análises da bioquímica clínica estão divididas entre dois setores do laboratório: setor Core e setor das Análises Especiais.

5.1 Setor Core

A maioria das análises de bioquímica clínica são realizadas no setor Core. O Core encontra-se altamente automatizado, atributo essencial à grande afluência de amostras analisadas diariamente (~7.000 tubos / dia). Os produtos analisados com maior frequência neste setor são amostras de soro e amostras de urina.

Neste setor foi possível contactar com o ambiente de um laboratório de análises clínicas de grande calibre e com a sua respetiva automatização durante 2 semanas (aproximadamente 80 horas). Foi possível ter um papel ativo na manutenção do funcionamento correto dos analisadores, com a programação de controlos de qualidade e calibrações, substituição de reagentes e fluídos, colocação de pipetas e cuvetes, e esvaziamento de lixo. Também tive a oportunidade de participar na gestão de amostras com a sua colocação e programação nos analisadores e monitorização de fichas de faltas, assim como na preparação de reagentes e reconstituição de controlos e calibradores.

O Core está dividido em três linhas de serviço: as linhas 1 e 2 possuem dois analisadores de química clínica (Atellica® CH Analyzer) e um analisador de imunoensaios (Atellica® IM Analyzer) e a linha 3 possui apenas um Atellica® CH Analyzer e dois Atellica® IM Analyzer. Todas as linhas estão conectadas ao Aptio® Automation e possuem um Atellica® Sample Handler. Para além dos autoanalisadores, o setor possui dois aparelhos para a eletroforese de proteínas, CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING.

5.1.1 Aptio® Automation

A automatização das diferentes componentes analíticas torna-se fundamental aquando de um volume de amostras significativo de modo a reduzir o número de erros e o tempo necessário para a obtenção dos resultados.

O Aptio® Automation (Figura 2) é constituído por vários módulos pré-analíticos: IOM (*Input/Output Module*) onde são colocadas amostras em locais definidos (e.g. amostras seladas ou sem tampa) e também retiradas (e.g. erros, sem pedidos); RIM (*Rack Input Module*) onde são colocadas racks com a maioria das amostras que saem do setor de triagem; DM (*Decapping Module*) que retira as tampas dos tubos e SVD (*Sample-Volume Detection*) que verifica o volume de amostra e reenvia para o IOM se este for insuficiente. Possui também módulos pós-analíticos: TSM (*Tube Sealer Module*) que sela os tubos para armazenamento através do SRM (*Storage Retrieval and Disposal Module*) (9, 10).



Figura 2. Linha de trabalho com diferentes módulos pré-analíticos e pós-analíticos Aptio® Automation da Siemens Healthineers (10).

5.1.2 Atellica® CH 930 Analyzer

O analisador Atellica® CH 930 Analyzer (Figura 3) tem a capacidade de realizar testes fotométricos (espectrofotometria e turbidimetria) e testes de potenciometria IMT (*Integrated Multisensor Technology*). Permite analisar diferentes tipos de amostras: soro, plasma, líquido cefalorraquidiano (LCR), urina e sangue total (11, 12).



Figura 3. Autoanalisador de testes fotométricos e potenciometria Atellica® CH 930 Analyzer da Siemens Healthineers (12).

5.1.3 Espectrofotometria

Os métodos espectroscópicos medem a intensidade de luz absorvida por uma solução num determinado comprimento de onda. A concentração de um analito pode ser determinada pela existência de uma relação linear entre a absorbância e a concentração do analito na solução (lei de *Beer-Lambert*) (2).

Um fotômetro ou espectrofotômetro (Figura 4) contém seis componentes básicos numa configuração de feixe único ou duplo: fonte de luz; filtro, que isola uma região específica do espectro eletromagnético; suporte de amostra; detetor de radiação; processador de sinal e um dispositivo de leitura (3).

A fonte de luz policromática fornece energia eletromagnética em que uma parte do espectro emitido é isolado pelo filtro de comprimento de onda. A amostra num recipiente adequado (e.g. cuvete) absorve uma fração da luz incidente e transmite a restante. A luz transmitida atinge fotodetetor e gera um sinal elétrico (3).

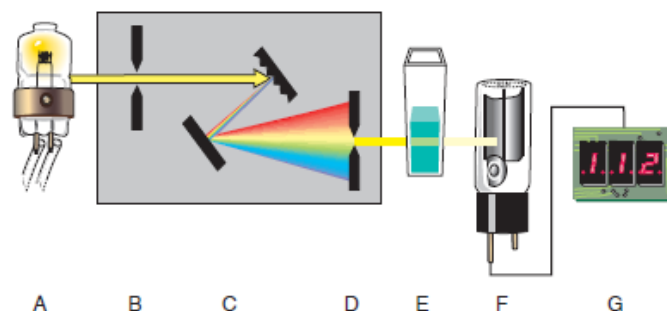


Figura 4. Componentes de um espectrofotômetro de feixe único (3).

A - fonte de luz; B - fenda de entrada; C – monocromador; D - fenda de saída; E – cuvete com a amostra; F – fotodetetor; G – dispositivo de leitura.

5.1.4 Turbidimetria e Nefelometria

A turbidez resulta numa diminuição da intensidade do feixe de luz que passa por uma solução turva devido à dispersão, refletância e absorção da luz por partículas em suspensão (2, 3). A luz transmitida na direção direta é detetada (Figura 5). As reações de anticorpos-antígenos podem causar turbidez, e a turbidimetria pode ser usada num imunoensaio para quantificar um analito (2).

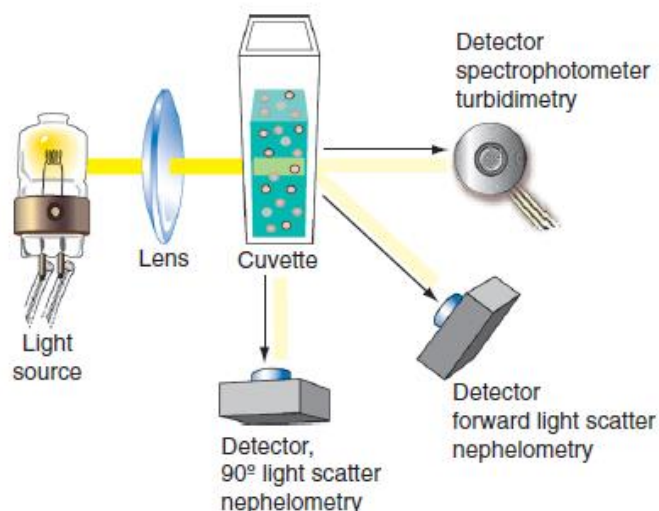


Figura 5. Arranjo óptico da turbidimetria e da nefelometria (3).

Na nefelometria, a luz dispersa pelas partículas em suspensão é medida normalmente de 15 a 90° em relação ao feixe incidente na cuvete (Figura 5). A dispersão da luz depende do comprimento de onda da luz incidente e do tamanho da partícula. Tal como a turbidimetria, a nefelometria é comumente usada em imunoensaios (2, 3).

5.1.5 Potenciometria

Os elétrodos ião-seletivos ou ISE (*Ion-Selective Electrodes*) (Figura 6) interagem seletivamente com um determinado ião e medem a sua concentração através do potencial produzido na interface membrana-amostra, que é proporcional ao logaritmo da concentração do ião (equação de *Nernst*). Nos ISE, uma membrana específica é usada para que apenas os iões de interesse possam alcançar o elétrodo e criar o potencial de membrana (2).

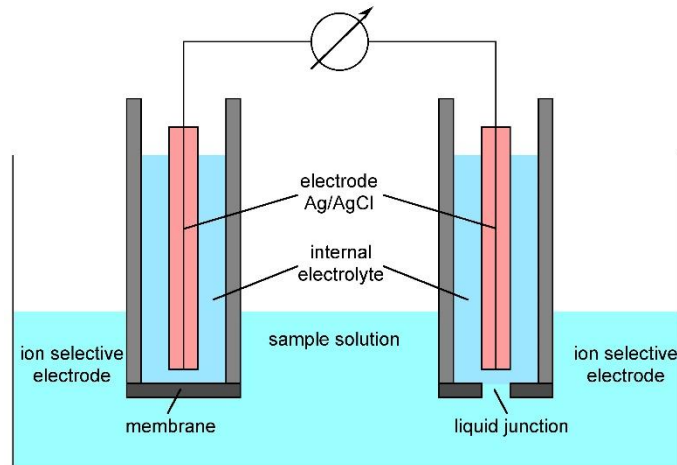


Figura 6. Configuração de um ISE (13).

5.1.6 Atellica® IM 1600 Analyzer

O analisador Atellica® IM 1600 Analyzer (Figura 7) realiza testes de quimioluminescência de diversos tipos (*sandwich*, competitivo). Permite analisar amostras de soro, plasma, líquido amniótico, urina e sangue total (11, 12).



Figura 7. Autoanalisador de imunoensaios por quimioluminescência Atellica® IM 1600 Analyzer da Siemens Healthineers (12).

5.1.7 Quimioluminescência

A quimioluminescência consiste na emissão de luz criada a partir de uma reação química ou eletroquímica. A reação química produz um composto eletronicamente excitado que emite luz ao retornar ao seu estado fundamental, ou que transfere a sua energia para outro composto (3).

A quimioluminescência é detetada por meio de um luminômetro, contém um fotomultiplicador (Figura 8) no qual os fótons são convertidos em elétrons e há uma amplificação do sinal, em que a corrente resultante é proporcional à quantidade de luz (3).

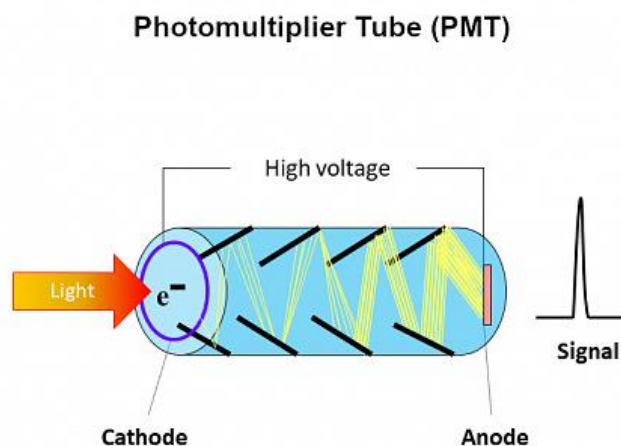


Figura 8. Funcionamento de um fotomultiplicador (14).

5.1.8 Imunoensaios

Os imunoensaios são usados na análise de mais de 100 analitos diferentes. Estes ensaios usam volumes de amostra muito pequenos (10 a 50 μL) e os reagentes podem ser armazenados no analisador, geralmente estáveis por 1 a 2 meses. Os resultados podem ser obtidos entre 10 a 30 minutos (2).

Os imunoensaios podem ser classificados em duas grandes categorias: imunoensaio competitivo (Figura 9), que usa apenas um anticorpo específico para a molécula do analito e imunoensaio não competitivo (*sandwich*) (Figura 10), que usa dois anticorpos específicos do analito que reconhecem diferentes partes da molécula (2).

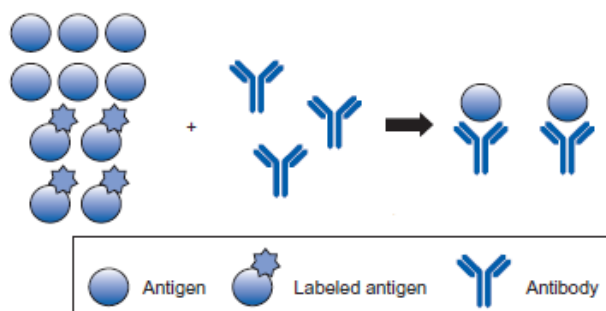


Figura 9. Imunoensaio competitivo. Adaptado de Dasgupta *et al.* (2).

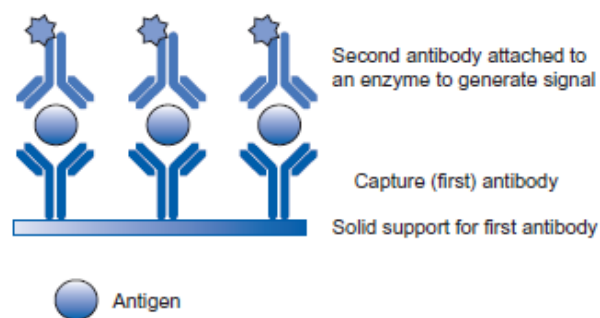


Figura 10. Imunoensaio em formato sandwich. Adaptado de Dasgupta *et al.* (2).

No imunoensaio competitivo (Figura 9), quantidades conhecidas de antígeno marcado e os antígenos na amostra são misturados e reagem competitivamente com anticorpos presentes numa fase sólida. Após a reação atingir o equilíbrio, o complexo imune preso na fase sólida é separado através da lavagem da mistura (3). O sinal obtido é inversamente proporcional à concentração de analito na amostra (2).

No imunoensaio em formato *sandwich* (Figura 10), os anticorpos de captura específicos para o analito são imobilizados num suporte sólido. Após a adição da amostra, o segundo anticorpo conjugado a uma molécula que gera um sinal (e.g. enzima) é adicionado. A concentração do analito é diretamente proporcional à intensidade do sinal (2).

5.1.9 CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING

O CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING (Figura 11) utiliza eletroforese capilar para a separação de proteínas em amostras de soro, urina, sangue total e sangue do cordão umbilical (15).

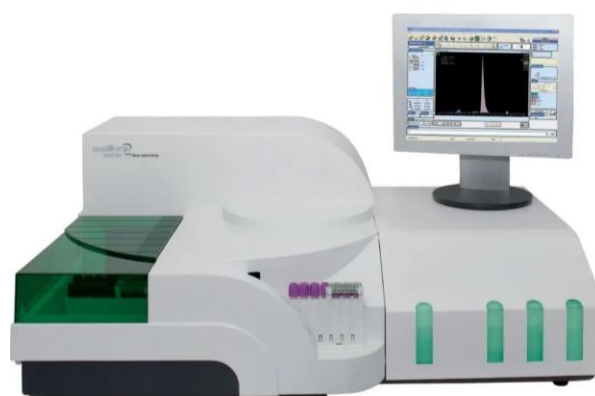


Figura 11. Sistema de eletroforese capilar CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING da Sebia (15).

5.1.10 Eletroforese e densitometria

A eletroforese consiste na separação de compostos com base na sua carga elétrica. Quando uma voltagem é aplicada a uma solução salina, uma corrente elétrica é produzida pelo fluxo de íões. Quanto maiores as cargas líquidas de um composto dissolvido, mais rápido este se move em direção ao eletrodo de carga oposta. Uma vez concluída a eletroforese, o meio de suporte (e.g. agarose) é tratado com um corante (e.g. *Sudan Black B*) para identificar as frações separadas. Para obter um perfil quantitativo das frações separadas é realizada uma densitometria (3).

Um sistema de eletroforese capilar (Figura 12) é composto por: um capilar de sílica fundida; 2 reservatórios de tampão eletrolítico; uma fonte de alimentação de alta tensão e um detetor ligado a uma unidade de aquisição de dados. À medida que os compostos da amostra migram em direção à saída capilar, diferentes tipos de detetores (e.g. detetores óticos) são usados para os detectar e quantificar (3).

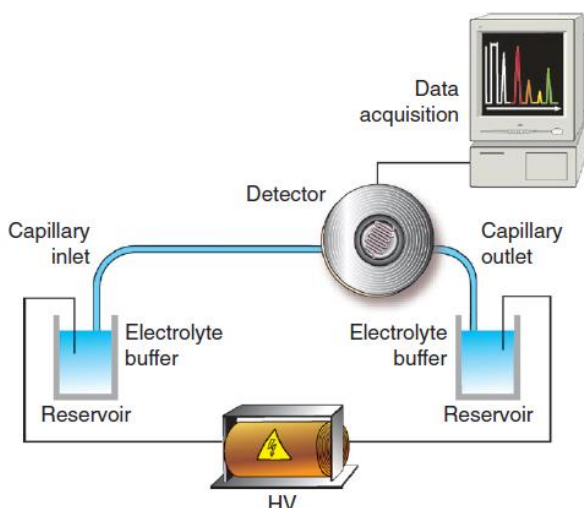


Figura 12. Sistema de eletroforese capilar (3).

HV – fonte de alimentação de alta tensão.

5.2 Setor Análises Especiais

O setor das Análises Especiais é um setor onde são realizadas análises que não fazem parte dos testes laboratoriais de rotina. Na componente de bioquímica clínica, o setor possui aparelhos que realizam imunoenaios (IDS-iSYS), LC-MS/MS (*Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometry*), ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e eletroforese.

Neste setor, onde estive uma semana (40 horas) não foi possível ter um papel ativo nos diversos procedimentos, mas houve a oportunidade de acompanhar as diferentes etapas analíticas de cada método e interpretar alguns dos resultados obtidos.

5.2.1 API 5000®

O API 5000® (Figura 13) é um dos sistemas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem usados no laboratório. O sistema API 5000® é projetado para a análise quantitativa de pequenas moléculas, tais como drogas ou metabolitos na urina ou outro fluido corporal (16).



Figura 13. Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem API 5000® da AB SCIEX (16).

5.2.2 PlasmaQuant MS

O PlasmaQuant MS (Figura 14) determina as concentrações de até 75 elementos químicos por ICP-MS (17).



Figura 14. Espectrómetro de massa por plasma indutivamente acoplado PlasmaQuant MS Elite da Analytik Jena (17).

5.2.3 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa ou MS (*Mass Spectrometry*) é baseada na fragmentação e ionização de moléculas usando uma fonte de energia. As massas dos fragmentos resultantes e a sua abundância relativa produzem um espectro de massa característico da molécula original (Figura 15) (3).

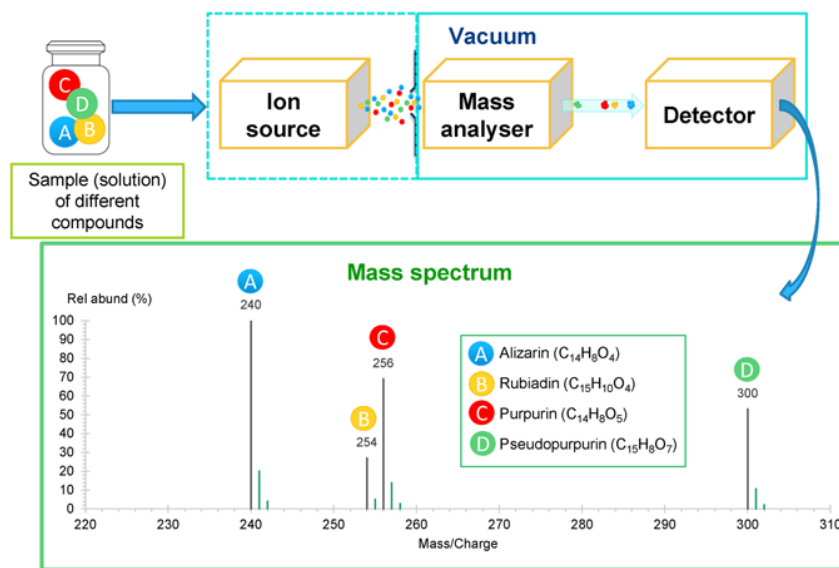


Figura 15. Componentes de um espectrômetro de massa e o espectro de massa resultante dos compostos presentes em solução (18).

Todos os espectrômetros de massa têm três componentes básicos: uma fonte de íões, um analisador de massa e um detetor de íões (Figura 15). Na MS, a molécula original é convertida num fluxo de íões que são separados pela razão massa/carga (m/z). Segue-se a contagem do número de íões de cada tipo ou medição da corrente produzida quando os íões atingem um transdutor (3).

Antes de um composto ser quantificado por MS, deve ser isolado por outro método. Os espectrômetros de massa modernos são acoplados a um sistema de cromatografia líquida e podem realizar separações em tandem (LC-MS/MS): uma etapa de ionização suave adicional permite a separação dos íões formados inicialmente, que podem ser identificados pelos seus padrões de fragmentação individuais (3).

A espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado pode ser usada para analisar a maioria dos elementos (metais e não metais) encontrados na tabela periódica. Nesta técnica, as amostras são introduzidas em plasma de argônio como gotículas de aerossol, onde são formados íões de carga única. A tecnologia ICP-MS também é capaz de medir isótopos de um determinado elemento. Um método de separação adicional, como HPLC, pode ser acoplado ao ICP-MS (2).

5.2.4 Nexera HPLC

O sistema Nexera (Figura 16) é um dos aparelhos de HPLC usados no setor Análises Especiais. Estes sistemas possuem três módulos principais: um *Autosampler*; um sistema de bomba mecânica e um detetor (19).



Figura 16. Sistema cromatografia líquida de alta eficiência Nexera 40 Series da Shimadzu (19).

5.2.5 Cromatografia

A cromatografia é um método de separação com base em diferentes interações dos compostos de uma amostra com uma fase móvel e com uma fase estacionária. Compostos que interagem mais fortemente com a fase estacionária são retidos por mais tempo do que aqueles que favorecem a fase móvel. As técnicas cromatográficas podem ser classificadas de acordo com sua fase móvel: cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC). O tempo de retenção é característico de um composto e está relacionado à força da sua interação com a fase estacionária e a fase móvel (3).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma forma viável de cromatografia líquida que oferece vantagens sobre outras formas de LC e GC. A HPLC usa suportes pequenos e rígidos e bombas mecânicas especiais que passam a fase móvel pela coluna a alta pressão. A resolução alcançada com colunas de HPLC é superior à de outras formas de cromatografia líquida e os tempos de análise são geralmente muito mais curtos. Um sistema típico de HPLC consiste em: fase móvel líquida; injetor de amostra; bomba mecânica; coluna; detetor e um registrador de dados (Figura 17) (3).

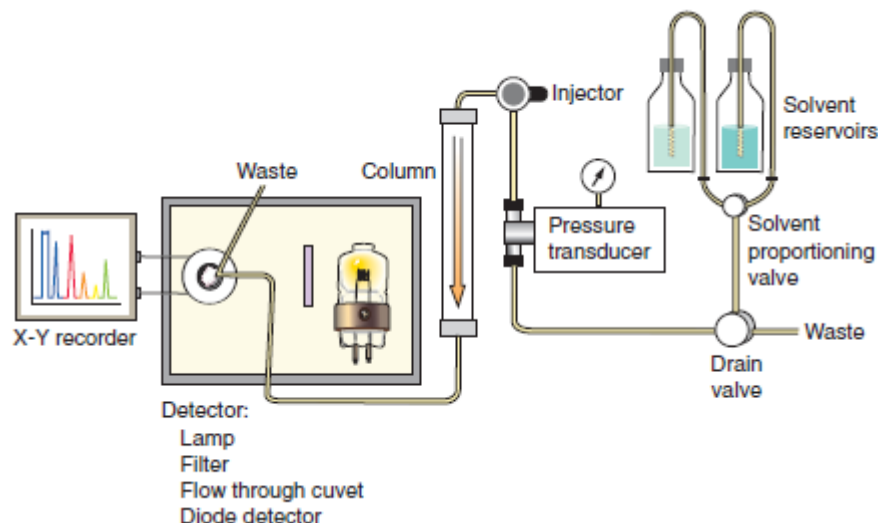


Figura 17. Componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (3).

5.3 Análises de Bioquímica Clínica

5.3.1 Metabolismo de hidratos de carbono e diabetes

Diabetes mellitus (DM) refere-se a um grupo de distúrbios metabólicos comuns que compartilham o fenótipo de hiperglicemia. A DM tipo 1 desenvolve-se como resultado de autoimunidade contra as células β produtoras de insulina, resultando na deficiência de insulina. A DM tipo 2 é um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por graus variáveis de resistência à insulina, secreção diminuída de insulina e aumento da produção hepática de glicose (20). Tanto a diabetes tipo 1 quanto a tipo 2 são precedidas por um período de deterioração progressiva da homeostase da glicose: anomalia da glicemia de jejum ou tolerância diminuída à glicose (20, 21). A intolerância à glicose que se desenvolve durante o segundo ou terceiro trimestre da gravidez é classificada como diabetes gestacional (20, 21).

Segundo a Norma da Direcção-Geral da Saúde (DGS) para o Diagnóstico e Classificação da *Diabetes mellitus*, o diagnóstico de diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros: glicemia de jejum; glicemia ocasional (com sintomas clássicos); prova de tolerância à glicose oral (PTGO) e hemoglobina glicada A1c (HbA1c) (Tabela 1) (21).

A medição da HbA1c é o método padrão para avaliar o controle glicémico a longo prazo. Quando a glicose plasmática está consistentemente elevada, há um aumento na glicação da hemoglobina. A HbA1c reflete a história glicémica dos 2 a 3 meses anteriores, porque os eritrócitos têm uma vida média de 120 dias (20).

Tabela 1. Parâmetros usados no diagnóstico de diabetes e valores patológicos definidos na Norma da DGS Nº 002/2011; métodos e instrumentos analíticos usados para a medição dos respectivos parâmetros no laboratório.

	Método	Instrumento	Valor patológico (21)
Glicemia de jejum	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	≥ 126 mg/dl
Glicemia ocasional			≥ 200 mg/dl (+ sintomas)
PTGO (75g, 2h)			≥ 200 mg/dl
HbA1c	HPLC	Hb9210® Premier	≥ 6,5%

HbA1c – Hemoglobina Glicada A1c; PTGO – Prova de Tolerância à Glicose Oral.

5.3.2 Metabolismo de lípidos e dislipidemias

Os distúrbios do metabolismo das lipoproteínas são chamados de dislipidemias. As dislipidemias são geralmente caracterizadas por níveis aumentados de colesterol, triglicerídeos ou ambos, acompanhados por níveis reduzidos de colesterol HDL (*High-Density Lipoprotein*). A principal razão para o diagnóstico de dislipidemias é o risco cardiovascular (CV) aumentado (20).

Segundo a Norma da DGS para a Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Dislipidemias no Adulto, o diagnóstico das dislipidemias realiza-se pela avaliação laboratorial no sangue, e em jejum de 12 horas de: colesterol total; triglicerídeos; colesterol HDL e colesterol LDL (*Low-Density Lipoprotein*) (Tabela 2) (22).

Tabela 2. Parâmetros de diagnóstico de dislipidemias segundo a Norma da DGS Nº 066/2011; Métodos e instrumentos analíticos usados no laboratório para a medição dos respectivos parâmetros.

	Método	Instrumento	Valores de referência (23)
Colesterol total	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	< 190 mg/dl
Colesterol HDL			> 40 mg/dl ♂ > 45 mg/dl ♀
Colesterol LDL			< 115 mg/dl
Triglicerídeos			< 150 mg/dl
Lp (a)	Imunoturbidimetria		-
Apo B			-

Apo B – Apolipoproteína B; Lp(a) – Lipoproteína (a).

Em doentes com elevado risco CV ou história familiar de doença aterosclerótica prematura pode ser considerada a determinação da lipoproteína (a) [Lp (a)]. A Apolipoproteína B (Apo B) é considerada um marcador de risco semelhante ao colesterol

5.3.3 Ionograma

A água é um dos principais constituintes do corpo humano, dois terços da água estão associados ao fluido intracelular e um terço é encontrado no fluido extracelular. Um eletrólito extracelular importante é o sódio (Na^+), enquanto o potássio (K^+) é o principal eletrólito intracelular. Outros eletrólitos importantes do corpo humano são o cloreto (Cl^-) e o bicarbonato (HCO_3^-) (2).

Estes quatro eletrólitos desempenham papéis importantes na fisiologia humana, incluindo: manutenção da homeostase da água e do pH, participação em várias reações fisiológicas e são também cofatores para algumas enzimas. Desta forma, o ionograma (doseamento do Na^+ , K^+ e Cl^-) é frequentemente pedido para avaliar o equilíbrio eletrolítico (Tabela 3) (2).

Tabela 3. Método e instrumento analítico usados para o doseamento do sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-).

	Método	Instrumento	Valores de referência (24)
Na^+	Potenciometria	Atellica® CH Analyzer	135 - 145 mmol/L
K^+			3,6 - 5,2 mmol/L
Cl^-			99 - 109 mmol/L

5.3.4 Função renal

Os rins têm três funções fisiológicas muito importantes: função excretora (remoção de produtos indesejáveis do metabolismo através da formação da urina); função reguladora (equilíbrio ácido-base e homeostase) e função endócrina (2).

A taxa de filtração glomerular (TFG) é uma medida da capacidade funcional do rim e é um parâmetro importante para avaliar a função renal. Uma estimativa da TFG pode ser calculada usando valores de creatinina sérica (Tabela 4) (2). A cistatina C também pode ser usada para calcular a TFG e, em contraste com a creatinina, as concentrações plasmáticas não são afetadas pelo sexo, dieta ou massa muscular. A ureia e o ácido úrico, assim como a proteinúria também são parâmetros usados para avaliar a função renal (2).

Tabela 4. Parâmetros de avaliação da função renal e respectivos métodos e instrumentos analíticos com que são doseados.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
Creatinina sérica	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	0,74 – 1,35 mg/dl ♂ 0,59 – 1,04 mg/dl ♀
Ureia sérica			8 – 24 mg/dl ♂ 6 – 21 mg/dl ♀
Ácido úrico sérico			3,7 – 8,0 mg/dl ♂ 2,7 – 6,1 mg/dl ♀
Microalbumina	Imunoturbidimetria		-
Cistatina C			0,63 – 1,03 mg/L 0,67 – 1,21 mg/L (≥ 50 anos)
Proteínas totais na urina	Turbidimetria		
Eletroforese de proteínas na urina	Eletroforese capilar	CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING	-

5.3.5 Função hepatobiliar

Os hepatócitos constituem a maioria das células do fígado, e desempenham numerosos papéis vitais na manutenção da homeostase e da saúde. Essas funções incluem: síntese de proteínas séricas essenciais (e.g. albumina, fatores de coagulação); produção de bile e seus transportadores; regulação de nutrientes e metabolismo e conjugação de compostos lipofílicos (e.g. bilirrubina, drogas) para excreção na bile ou na urina (20).

Alguns exames usados para avaliação da doença hepática incluem a medição dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, bilirrubina e albumina (Tabela 5) (20). Os padrões de anormalidades podem ajudar a distinguir uma doença hepatocelular de colestática e ajudar a determinar se a doença é aguda ou crônica. Outros exames laboratoriais podem ser úteis, como γ -glutamyl transpeptidase (GGT) (20).

Tabela 5. Parâmetros de avaliação da função e lesão hepática e respetivo método e instrumento analítico de medição.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
ALT	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	7 – 55 U/L ♂ 7 – 45 U/L ♀
AST			8 – 48 U/L ♂ 8 – 43 U/L ♀
Fosfatase alcalina			40 – 129 U/L ♂ 35 – 104 U/L ♀
Bilirrubina direta			0,0 – 0,3 mg/dl
Bilirrubina total			≤ 1,2 mg/dl
Albumina			3,5 – 5,0 g/dl
GGT			8 – 61 U/L ♂ 5 – 36 U/L ♀

ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase; GGT – γ-Glutamil Transpeptidase.

5.3.6 Função pancreática

As secreções pancreáticas fornecem enzimas e bicarbonato necessários para ajudar na atividade digestiva do trato gastrointestinal e manter o pH ideal para a função dessas enzimas. Os níveis séricos das enzimas amilase e lipase são amplamente utilizados como testes de rastreio de pancreatite aguda (Tabela 6) (20).

Tabela 6. Enzimas usadas na avaliação da função pancreática e respetivo método e instrumento analítico usados na sua medição.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
Amilase	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	28 – 100 U/L
Lipase			13 – 60 U/L

5.3.7 Função da tireoide

A glândula tireoide produz duas hormonas, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). Estas hormonas desempenham um papel crítico na diferenciação celular e organogénese durante o desenvolvimento e ajudam a manter a homeostase termogénica e metabólica no adulto. A TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) desempenha um papel fundamental no

controle do eixo tireoidiano e serve como um marcador fisiológico da ação das hormonas da tiroide (20). O teste de função da tiroide mais comumente solicitado é a TSH, seguido por T4 (total ou livre) e T3 (total ou livre) (Tabela 7) (2).

Tabela 7. Parâmetros de avaliação da função da tiroide e respetivos método e instrumento analítico de medição.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
T3 livre	Quimioluminescência	Atellica® IM Analyzer	2,8 – 4,4 pg/ml
T3 total			80 – 200 ng/dl
T4 livre			0,9 – 1,7 ng/dl
T4 total			4,5 – 11,7 µg/dl
TSH			0,3 – 4,2 µU/ml

T3 – Triiodotironina; T4 – Tiroxina; TSH – *Thyroid-Stimulating Hormone*.

5.3.8 Marcadores cardíacos

Os biomarcadores cardíacos são libertados na circulação devido a dano ou morte dos miócitos cardíacos. A medição desses biomarcadores no soro ou plasma é útil no diagnóstico de enfarte do miocárdio. Alguns biomarcadores bastante utilizados para avaliação da necrose miocárdica são: mioglobina, CK (*Creatine Kinase*), creatina cinase do tecido cardíaco (CK-MB) e TnIH (*High-Sensitivity Troponin I*) (Tabela 8). Existem também biomarcadores para avaliar o estresse miocárdico: BNP (*B-type Natriuretic Peptide*) ou o seu precursor NT-proBNP (*N-Terminal pro-B-type Natriuretic Peptide*) (2).

Tabela 8. Marcadores cardíacos usados na avaliação da necrose e estresse miocárdicos e respetivos métodos e instrumentos analíticos usados no seu doseamento.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
CK	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	39 – 308 U/L ♂ 26 – 192 U/L ♀
CKMB (massa)			-
BNP		Atellica® IM Analyzer	Consoante idade e sexo
NT-proBNP			
TnIH			≤ 20 ng/L ♂ ≤ 15 ng/L ♀
Mioglobina			≤ 90 µg/L

BNP – B-Type Natriuretic Peptide; CK – Creatine Kinase; CKMB – Creatina Cinase do Tecido Cardíaco; NT-proBNP – N-Terminal pro-B-type Natriuretic Peptide; TnIH – High-Sensitivity Troponin I.

5.3.9 Metabolismo ósseo

O esqueleto é metabolicamente ativo e sofre remodelação contínua ao longo da vida. Essa remodelação é necessária para manter a integridade estrutural do esqueleto e as funções metabólicas como depósito de cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e outros íons. A concentração plasmática destes compostos depende do balanço de deposição e reabsorção mineral óssea, absorção intestinal e excreção renal (Tabela 9) (3, 20). As principais hormonas que regulam esses processos são a PTH (*Parathyroid Hormone*), a calcitonina e a forma ativa da vitamina D, 1,25-diidroxivitamina D (1,25(OH)₂D) (2, 20).

Tabela 9. Parâmetros usados no estudo do metabolismo ósseo e respetivos métodos e instrumentos analíticos usados na medição destes parâmetros.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
Ca	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	8,6 – 10,0 mg/dl
Mg			8,8 – 10,2 mg/dl (≥ 60 anos)
P			1,7 – 2,3 mg/dl
PTH	Quimioluminescência	Atellica® IM Analyzer	2,5 – 4,5 mg/dl
Vitamina D total			15 – 65 pg/ml
1,25(OH)₂D		IDS-iSYS	-
			18 – 64 pg/ml ♂
			18 – 78 pg/ml ♀

Ca – Cálcio; Mg – Magnésio; P – Fósforo; PTH – *Parathyroid Hormone*.

5.3.10 Metabolismo do ferro, anemia ferripriva e megaloblástica

Nas células eritroides, a deficiência em ferro prejudica a síntese de hemoglobina, desenvolvendo-se anemia e redução da libertação de oxigénio para os tecidos. A anemia ferripriva é a anemia mais comum, seguida pela anemia da inflamação. A anemia da inflamação também está relacionada, em parte, ao metabolismo anormal do ferro. Existem diversos parâmetros de avaliação do metabolismo do ferro: ferro (Fe) sérico; CTFF (Capacidade Total de Fixação de Ferro); ferritina; transferrina e sTfR (*Soluble Transferrin Receptor*) (Tabela 10) (20).

Tabela 10. Parâmetros de avaliação do metabolismo do ferro e respectivos métodos e instrumentos analíticos com que são medidos.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
Fe	Espectrofotometria	Atellica® CH Analyzer	50 – 150 µg/dl ♂ 35 – 145 µg/dl ♀
CTFF	Imunoturbidimetria		250 – 400 µg/dl
Transferrina			200 – 360 mg/dl
sTfR			1,8 – 4,6 mg/L
Ferritina	Quimioluminescência	Atellica® IM Analyzer	24 – 336 µg/L ♂ 11 – 307 µg/L ♀

CTFF - Capacidade Total de Fixação de Ferro; Fe – Ferro; sTfR – *Soluble Transferrin Receptor*.

As anemias megaloblásticas são um grupo de distúrbios caracterizados por alterações morfológicas das células eritroides na medula óssea. Estas anemias podem ser causadas por uma deficiência de cobalamina (vitamina B12) ou folato (Tabela 11), anormalidades genéticas ou adquiridas que afetam o metabolismo dessas vitaminas, ou devido a defeitos na síntese de DNA (20).

Tabela 11. Método e instrumento analítico usados para o doseamento de folato e vitamina B12.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
Folato	Quimioluminescência	Atellica® IM Analyzer	≥ 4,0 µg/L
Vitamina B12			180 – 914 ng/L

5.3.11 Vitaminas e elementos vestigiais

As vitaminas e os minerais (Tabela 12) desempenham vários papéis na saúde, em que tanto a deficiência quanto o excesso podem causar doença (e.g. intoxicação por vitamina A e doença hepática). As deficiências de vitaminas e minerais podem também ser causadas por estados de doença, como má absorção (20).

Tabela 12. Vitaminas doseadas no laboratórios e métodos e instrumentos analíticos usados para o doseamento das vitaminas e dos elementos vestigiais.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
Vitamina B1	HPLC	Nexera 40 series	70 – 180 nmol/L
Vitamina B6			5 – 50 µg/L
Vitamina A	LC-MS/MS	Waters HPLC	32,5 – 78,0 µg/dl
Vitamina C			0,4 – 2,0 mg/dl
Vitamina E			5,5 – 17,0 mg/L
Elementos vestigiais	ICP-MS	PlasmaQuant MS	-

5.3.12 Marcadores tumorais e catecolaminas

A maioria dos marcadores tumorais (Tabela 13) é produzida por células normais, bem como por células tumorais, porém, no processo de desenvolvimento de cancro, as concentrações desses marcadores aumentam (2). Além do sangue, esses marcadores também são encontrados na urina, fezes ou fluidos corporais.

Alguns marcadores tumorais estão correlacionados com apenas um tipo de cancro, enquanto outros estão associados a dois ou mais tipos. Os marcadores tumorais não são o parâmetro de referência para o diagnóstico de um tumor mas podem ser usados para monitorizar a recuperação de um paciente (2).

Tabela 13. Marcadores tumorais e o seu uso clínico; instrumento e método analítico com que os marcadores tumorais são doseados.

	Uso (2)	Instrumento	Método
AFP	Cancro hepatocelular e de células germinativas	Atellica® IM Analyzer	Quimioluminescência
CA 125	Cancro do ovário		
CA 15-3	Cancro da mama		
CA 19-9	Cancros pancreáticos e gastrintestinais		
CEA	Cancros colorretais, gástricos, pancreáticos, pulmonares e da mama		
PSA complexado, livre e total	Cancro da próstata		

AFP – Alfa-fetoproteína; CA – Cancer Antigen; CEA – Carcinoembryonic Antigen; PSA – Prostate Specific Antigen.

Os tumores secretores de catecolaminas estão localizados na medula adrenal (feocromocitoma) ou no tecido paraganglionar extra-adrenal (paraganglioma). Os testes laboratoriais consistem na medição de catecolaminas na urina ou no plasma (excreção de metanefrinas na urina de 24 horas ou metanefrinas fracionadas no plasma). A medição na urina é menos sensível, mas mais específica (20). O doseamento de catecolaminas e os seus metabolitos é realizado por HPLC.

5.3.13 Endocrinologia reprodutiva

A função reprodutiva normal é mediada por uma variedade de hormonas sintetizadas e secretadas pelas gónadas, glândulas suprarrenais, hipófise, hipotálamo e placenta (Tabela 14) (3).

Tabela 14. Hormonas usadas na avaliação da função reprodutiva e gravidez. Métodos e instrumentos analíticos usados para o doseamento das respetivas hormonas.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
Estradiol	Quimioluminescência	Atellica® IM Analyzer	10 – 40 pg/ml ♂ 15 – 350 pg/ml ♀
FSH			1,2 – 15,8 IU/L ♂ CM ♀
LH			1,3 – 9,6 IU/L ♂ CM ♀
hCG			< 5 IU/L
Progesterona			< 0,20 ng/ml ♂ CM / G ♀
Prolactina			4,0 – 15,2 ng/ml ♂ 4,8 – 23,3 ng/ml ♀
Testosterona total			240 – 950 ng/dl ♂ 8 – 60 ng/dl ♀
17-OH Progesterona		IDS-iSYS	< 220 ng/dl ♂ CM / G ♀
Testosterona livre			Consoante a idade
DHEA	LC-MS/MS	API® 5000	Consoante a idade

CM - varia no ciclo menstrual; G – varia com a gravidez

DHEA – *Dehydroepiandrosterone*; FSH – *Follicle-Stimulating Hormone*; hCG – *Human chorionic gonadotropin*; hCG – *Human Chorionic Gonadotropin*.

5.3.14 Monitorização de fármacos e drogas de abuso

O objetivo da monitorização de fármacos é otimizar as respostas farmacológicas, evitando efeitos adversos. Para a maioria dos medicamentos, pode ser usado soro ou plasma para monitorizar e medir o nível mínimo do medicamento, exceto imunossupressores (e.g. ciclosporina), onde os níveis são medidos no sangue total (Tabela 15) (2).

Os testes de drogas de abuso geralmente são realizados numa amostra de urina com imunoensaios disponíveis comercialmente. Os resultados iniciais do teste de imunoensaio devem ser confirmados por um segundo método (Tabela 15) (2).

Tabela 15. Monitorização de fármacos e drogas de abuso e respetivos métodos e instrumentos analíticos pelos quais são doseados no laboratório.

	Método	Instrumento
Monitorização de fármacos (Carbamazepina, Digoxina, Gentamicina, Lítio, Fenobarbital, Fenitoína, Teofilina, Ácido Valpróico, Vancomicina)	Imunoturbidimetria	Atellica® CH Analyzer
Monitorização de fármacos (Imunossupressores e antimicóticos)	LC-MS/MS	API® 5000 Waters HPLC
Drogas de abuso / Toxicologia (Álcool etílico)	Espectrofotometria	Atellica® IM Analyzer
Drogas de abuso (e.g. canabinoides, opioides, cocaína)	LC-MS/MS (confirmação)	API® 5000

5.3.15 Pesquisa de sangue oculto

O teste imunoquímico fecal ou FIT (*Fecal Immunochemical Test*) é usado para detetar hemoglobina nos glóbulos vermelhos à superfície das fezes. O princípio do FIT baseia-se numa reação antigénio-anticorpo que tem especificidade para a hemoglobina humana no trato digestivo inferior. Quando o resultado do exame mostra um nível significativo de hemoglobina, pode ser sinal de sangramento causado por doenças gastrointestinais como o cancro colorretal (26).

Alguns países, como é o caso de Portugal, possuem um programa nacional de rastreio do cancro colorretal. Se os pacientes obtiverem um resultado anormal, são aconselhados a fazer um exame de colonoscopia (26, 27).

No laboratório Unilabs Porto Central, o analisador do FIT é o OC-SENSOR PLEDIA que se encontra no setor de triagem de urinas e fezes por uma questão de logística.

6 Imunologia

O sistema imunológico é estruturalmente complexo e capaz de proteger o organismo de doenças, neutralizando a entidade invasora. O sistema imunológico humano pode detetar uma ampla variedade de patógenos e certas células cancerígenas (2).

Nas doenças autoimunes, essa distinção é perdida e o sistema imunológico pode atingir certas células numa variedade de órgãos e causar doenças no próprio corpo. Distúrbios do sistema imunológico também podem causar doenças inflamatórias e cancro (2).

A imunidade pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa (específica). Os principais mecanismos de imunidade inata são a fagocitose, ativação enzimática, liberação de citocinas e ativação do complemento. Moléculas químicas envolvidas na imunidade inata incluem: moléculas do complemento; enzimas (*e.g.* lisozima) e proteína C-reativa (PCR) (Tabela 16) (2).

Três tipos de linfócitos (células T *helper*, células T citotóxicas e células B) medeiam a imunidade específica. Uma vez ativadas, as células B diferenciam-se em plasmócitos e produzem imunoglobulinas (Ig) (Tabela 16): IgG, classe dominante de imunoglobulinas que são produzidas como resposta secundária na imunidade adaptativa; IgM, resposta primária da imunidade adaptativa; IgA, encontrada nas secreções das membranas mucosas; IgE, necessárias para a defesa contra parasitas e IgD, presente como um receptor de superfície de células B (2).

Tabela 16. Parâmetros de avaliação da inflamação e respetivos métodos e instrumentos analíticos com que são doseados.

	Método	Instrumento	Valores de referência (25)
PCR	Imunoturbidimetria	Atellica® CH Analyzer	≤ 8,0 mg/L
IgG total			767 – 1,590 mg/dl
IgM total			37 – 286 mg/dl
IgA total			61 – 356 mg/dl
IgE total	Quimioluminescência	Atellica® IM Analyzer	≤ 214 kU/L

Ig – Imunoglobulina; PCR – Proteína C-reativa.

6.1 Eletroimunofixação

Eletroforese de proteínas séricas, eletroforese de urina, imunofixação sérica e imunofixação de urina são técnicas realizadas principalmente para investigar a suspeita de gamopatia monoclonal. A gamopatia monoclonal está presente quando uma proteína monoclonal é identificada no soro, na urina ou em ambos. A gamopatia monoclonal pode surgir devido a um mieloma ou a um distúrbio linfoproliferativo de células B (2).

Na imunofixação, a eletroforese de uma amostra é realizada usando cinco poços separados. Em seguida, cada amostra é sobreposta com diferentes anticorpos monoclonais: anti- γ (para detetar a cadeia pesada gama), anti- μ (para detetar a cadeia pesada mu), anti- α (para detetar a cadeia pesada alfa), anti- κ (para detetar a cadeia leve kappa) e anti- λ (para detetar a cadeia leve lambda) (2). Após a lavagem para remover os anticorpos não ligados, o papel gel é corado (Figura 18) (2, 3). A técnica de eletroimunofixação é realizada no setor de Análises Especiais no analisador HYDRASYS.

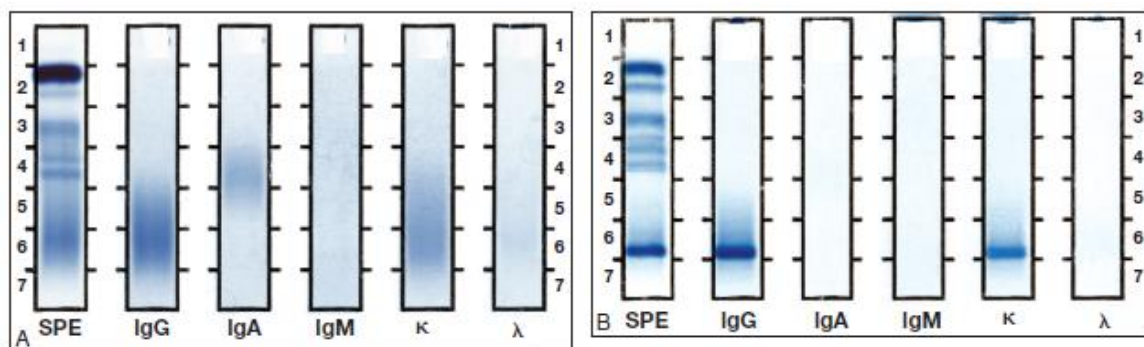


Figura 18. Imunoglobulinas monoclonais (Ig) demonstradas por imunofixação sérica. Adaptado de Richard *et al.* (3).

A - Padrão policlonal normal de imunoglobulinas. **B** - Imunoglobulina monoclonal IgG- κ no soro com perda da maioria das imunoglobulinas policlonais normais. SPE - todas as proteínas na amostra precipitaram com reagente ácido; IgG – reagiu com anti-IgG; IgA – reagiu com anti-IgA; IgM – reagiu com anti-IgM; κ – reagiu com anti-kappa; λ - reagiu com anti-lambda.

6.2 Reações de hipersensibilidade

6.2.1 Intolerância alimentar

A intolerância alimentar (hipersensibilidade alimentar) é uma reação imunológica a alimentos ou aditivos alimentares. O sistema imunológico identifica os antígenos alimentares como estranhos e passa a produzir anticorpos específicos da classe IgG. Essa resposta imune desencadeia uma reação inflamatória, que pode se tornar crônica (28).

O teste EUROLINE-FOOD determina semiquantitativamente IgG específicas para alimentos no soro ou plasma e contribui para o diagnóstico de intolerâncias contra alimentos e aditivos alimentares. O *kit* EUROLINE-FOOD contém tiras de teste revestidas com 54 alimentos e aditivos alimentares (28).

As tiras de teste são analisadas por ImunoBlot, no EUROBlotOne (Figura 19), que se encontra no setor de Análises Especiais. Se as amostras contiverem anticorpos específicos da classe IgG, estes ligam-se aos componentes antigénicos da tira. Para detetar os anticorpos ligados, uma segunda incubação é realizada usando uma IgG anti-humana marcada com uma enzima e catalisando uma reação colorimétrica (28).



Figura 19. Analisador de ImunoBlots EUROBlotOne da EUROIMMUN (29).

6.3 Autoimunidade

6.3.1 Anticorpos antinucleares

Anticorpos antinucleares ou ANA (*Antinuclear Antibodies*) são anticorpos dirigidos contra componentes do núcleo das células. Um teste de ANA é solicitado em pacientes com suspeita de doenças autoimunes, mais comumente em suspeita de lúpus eritematoso sistémico. Um teste de ANA pode ser realizado por ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) em células Hep-2 e o resultado é relatado em títulos (2, 30).

Num ensaio IFI, o soro do paciente é incubado com células Hep-2 (uma linha de células epiteliais humanas), seguido pela adição de globulina anti-humana marcada com fluoresceína. O soro é diluído em série até que este se torne negativo, o que fornece uma estimativa da força da positividade (2, 31).

ANA aparece em ensaios IFI como um padrão fluorescente em células que são fixadas a uma lâmina. Embora existam algumas sobreposições, diferentes padrões (Figura 20) podem estar associados a certas doenças autoimunes (2, 30).

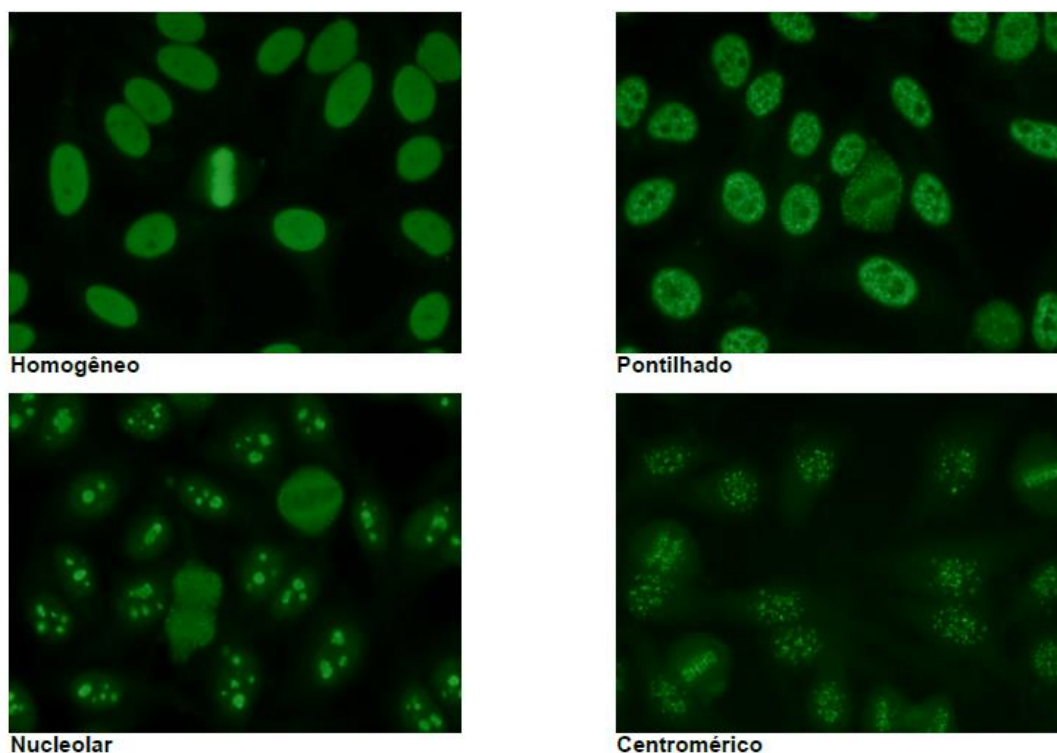


Figura 20. Padrões de fluorescência de ANA (*Antinuclear Antibodies*) num ensaio IFI (Imunofluorescência Indireta) com células Hep-2 (30).

Os ensaios de IFI são realizados nos analisadores Zenit PRO (Figura 21) e Zenit UP presentes no setor das Análises Especiais.



Figura 21. Analisador de ensaios de IFI (Imunofluorescência Indireta) Zenit PRO da A. Menarini Diagnostics (32).

Se um teste de ANA for positivo, devem ser realizados testes para vários outros anticorpos (e.g. anti-RNP) consoante o padrão obtido no ensaio IFI. Estes testes são realizados através de técnicas FEIA (*Fluoroenzyme Immunoassay*), um método quantitativo, realizado no instrumento ImmunoCAP® 250 (Figura 22). Os resultados obtidos são confirmados por Imunoblot no EUROBlotOne.

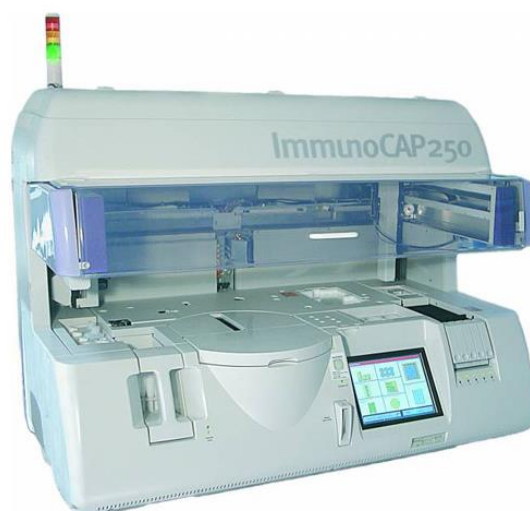


Figura 22. Analisador de ensaios FEIA (*Fluoroenzyme Immunoassay*) ImmunCAP® 250 da ThermoFisher Scientific (33).

6.3.2 AMA, ASMA, AGPA e LMK

Assim como os ANA, outros anticorpos relacionados a doenças autoimunes são estudados através das técnicas de IFI. Para a pesquisa destes anticorpos, a amostra é incubada em secções de tecido de rim, estômago e fígado de rato (34).

Anticorpos anti-mitocondriais ou AMA (*Anti-Mitochondrial Antibodies*) ocorrem principalmente em doentes com cirrose biliar primária. Os ASMA (*Anti-Smooth Muscle Antibodies*) ocorrem maioritariamente na hepatite crónica ativa e na hepatite viral aguda. Os AGPA (*Anti-Gastric Parietal Cell Antibodies*) estão associados a anemia perniciosa e gastrite crónica atrofica. Por fim, os anticorpos LKM (*Anti-Liver/Kidney/Microsomal*) são anticorpos que exibem um padrão de fluorescência do citoplasma do fígado e túbulos proximais do rim e são encontrados em pacientes com hepatite autoimune (34).

7 Imuno-hematoterapia

O setor de Imuno-hematoterapia é responsável por testes de compatibilidade sanguínea, grupos sanguíneos, provas de *Coombs* e preparação de unidades de componentes sanguíneos para transfusão. O laboratório Unilabs possui um acordo com o IPST (Instituto Português do Sangue e da Transplantação) e com vários hospitais. Estes hospitais requerem unidades de transfusão para cirurgias, enviando uma amostra de sangue do paciente e o laboratório recebe as respetivas unidades do IPST e realiza testes de compatibilidade sanguínea, grupo sanguíneo e prova de *Coombs*.

No período de 40 horas em que estive neste setor, foi possível acompanhar as várias etapas dos diferentes testes e preparação de unidades de transfusão e também

preparar as amostras de sangue e programar os respectivos testes nos instrumentos ORTHO AutoVue® Innova System (Figura 23).



Figura 23. Analisador automático de testes imunohematológicos ORTHO AutoVue® Innova System através de cassetes ORTHO BioVue® da Ortho Clinical Diagnostics (35).

7.1 Grupos sanguíneos

A maioria dos genes de grupos sanguíneos está localizada nos cromossomas autossômicos e é herdada de acordo com as regras de Mendel. A maioria dos alelos de grupos sanguíneos também demonstra codominância (3).

Muitas estruturas associadas à membrana nas células sanguíneas podem ser definidas como antígenos porque têm a capacidade de reagir com um anticorpo complementar ou recetor celular (3).

Clinicamente, cerca de 12 sistemas de antígenos são significativos e comumente utilizados no serviço de transfusão, como o sistema ABO e o sistema Rh (Tabela 17). Pacientes que não possuem certos antígenos podem formar anticorpos quando expostos a estes (3). Os grupos sanguíneos são determinados por aglutinação em *cards* ORTHO BioVue® que são preparados e analisados automaticamente.

Tabela 17. Sistema ABO e sistema Rh. Antígenos presentes na superfície dos eritrócitos e anticorpos presentes no plasma de cada grupo dos sistemas.

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O	Rh+	Rh-
Antígenos no eritrócito	Antígeno A	Antígeno B	Antígenos A e B	-	Antígeno D	-
Anticorpos no plasma	Anti-B	Anti-A	-	Anti-A e Anti-B	-	Anti-D

7.2 Prova de *Coombs*

O teste de globulina anti-humana, também chamado de prova de *Coombs*, pode ser usado para detetar anticorpos ligados a eritrócitos (prova de *Coombs* direta) ou detetar a reação de anticorpos e eritrócitos após uma fase de incubação apropriada (prova de *Coombs* indireta) (3).

A prova de *Coombs* direta pode ser usada para: investigação de reação hemolítica transfusional, diagnóstico de doença hemolítica do feto e do recém-nascido, diagnóstico de anemia hemolítica autoimune e investigação de hemólise induzida por drogas (3).

A prova de *Coombs* indireta pode ser usada para: detecção e identificação de anticorpos no recipiente de transfusão, prova cruzada ou *crossmatching* (detetar anticorpos que podem ter escapado) e tipagem de antígenos eritrocitários do dador ou paciente (3).

Numa primeira fase, a prova de *Coombs* é realizada de modo automático no ORTHO AutoVue® Innova System. Se a prova de *Coombs* indireta der positiva, os anticorpos são identificados manualmente usando painéis da Ortho Clinical Diagnostics.

7.3 Transfusões

Uma etapa crítica na preparação pré-transfusional é a colheita e identificação adequadas da amostra de sangue do recetor e da unidade de transfusão.

O teste pré-transfusão de rotina consiste na tipagem ABO e Rh e na triagem de anticorpos eritrocitários. Se a prova de *Coombs* indireta for positiva, testes de identificação de anticorpos devem ser realizados. Os resultados dos testes atuais devem ser comparados com os registos dos testes anteriores do paciente, se disponíveis (3).

A etapa final do teste de compatibilidade pré-transfusional é a prova cruzada. O objetivo da prova cruzada é uma verificação final da compatibilidade ABO e, a detecção de anticorpos não identificados (3). O teste de compatibilidade é realizado entre o soro ou plasma do recetor e os eritrócitos do dador no ORTHO AutoVue® Innova System.

8 Hematologia

O setor de Hematologia, tal como o setor Core, é altamente automatizado devido ao grande número de amostras analisadas diariamente. As principais análises realizadas neste setor são o hemograma, a velocidade de sedimentação (VS) e a HbA1c.

Primeiramente, os tubos entram na cadeia automatizada XN-9000, que possui 8 módulos XN para realizar o hemograma, um módulo SP para a preparação de lâminas e um módulo que separa os tubos para arquivo, outras análises (VS, HbA1c) ou tubos que necessitam de verificação manual por terem ocorrido erros durante a realização do

hemograma (e.g. presença de coágulos). A VS é determinada de forma automática em aparelhos CUBE 30 touch e a HbA1c em aparelhos Hb9210® Premier. As lâminas preparadas pelo módulo SP, são visualizadas em aparelhos CellaVision® DM96.

Durante 2 semanas (cerca de 80 horas) foi possível participar ativamente em várias etapas das diferentes análises realizadas no setor: colocação de *racks* na cadeia XN-9000; arrumação de tubos de arquivo; colocação dos tubos para HbA1c em *racks*; colocação e programação de tubos de VS e esvaziamento de lixo. Para além dessas atividades, tive a oportunidade de visualizar a manutenção diária dos aparelhos e garantia de controlo de qualidade, validação de resultados e visualizar e interpretar lâminas de esfregaços sanguíneos.

8.1 Hemograma

O hemograma é um estudo quantitativo e qualitativo das células sanguíneas. O hemograma é composto por parâmetros de avaliação da componente eritrocitária: contagem de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina e índices hematimétricos (Tabela 18).

Tabela 18. Parâmetros eritrocitários presentes no hemograma e respetiva definição e interpretação clínica.

	Definição e interpretação clínica (3)	Valores de referência (25)
RBC	Anemia (< VR) Policitemia (> VR)	4,35 – 5,65 x 10 ¹² /L ♂ 3,92 – 5,13 x 10 ¹² /L ♀
Hematócrito	% de eritrócitos no volume total de sangue Anemia (< VR) Policitemia (> VR)	38,3 – 48,6 % ♂ 35,5 – 44,9 % ♀
Hb	Anemia (< VR)	13,2 – 16,6 g/dl ♂ 11,6 – 15,0 g/dl ♀
VGM	Volume médio dos eritrócitos Microcítica (< VR) Macroscítica (> VR)	78,2 – 97,9 fL
HGM	Conteúdo de Hb média no eritrócito	27 – 33 pg
CHGM	Concentração média de Hb num determinado volume de eritrócitos Hipocromia (< VR)	31 – 36 g/dl
RDW	Amplitude de distribuição de tamanho dos eritrócitos Anisocitose eritrocitária (> VR)	11,8 – 14,5 % ♂ 12,2 – 16,1 % ♀

CHGM – Concentração da Hemoglobina Globular Média; Hb – Hemoglobina; HGM – Hemoglobina Globular Média; RDW - *Red Cell Distribution Width*; VGM – Volume Globular Médio.

Para além da avaliação da componente eritrocitária, o hemograma também tem como estudos a contagem de leucócitos e fórmula leucocitária, e contagem de plaquetas (Tabela 19).

Tabela 19. Parâmetros leucocitários e plaquetários presentes no hemograma.

	Valores de referência (25)	
	Valor absoluto	Valor relativo
Nº de leucócitos	3,4 – 9,6 x 10 ⁹ /L	
Neutrófilos	1,56 – 6,45 x 10 ⁹ /L	40 – 80 %
Linfócitos	0,95 – 3,07 x 10 ⁹ /L	20 – 40 %
Monócitos	0,26 – 0,81 x 10 ⁹ /L	2 – 10 %
Eosinófilos	0,03 – 0,48 x 10 ⁹ /L	1 – 6 %
Basófilos	0,01 – 0,08 x 10 ⁹ /L	1 %
Plaquetas	135 – 317 x 10 ⁹ /L ♂ 157 – 371 x 10 ⁹ /L ♀	

8.1.1 XN Series

Os aparelhos XN (Figura 24) determinam os diferentes parâmetros hematológicos do hemograma através de técnicas como a citometria de fluxo (e.g. contagem de leucócitos e reticulócitos) e impedância (e.g. contagem de eritrócitos e plaquetas).



Figura 24. Analisador de parâmetros hematológicos por citometria de fluxo de fluorescência e impedância por focalização hidrodinâmica XN-1000 Pure da Sysmex Europe (36).

8.1.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo mede múltiplas propriedades de células suspensas num meio líquido em movimento. À medida que cada partícula passa através de uma fonte de luz laser, produz um padrão de luz característico que é medido por vários detetores. A citometria de fluxo é usada para contar e classificar células, partículas virais, fragmentos de DNA e bactérias (3).

As alíquotas da suspensão de células são introduzidas na câmara de fluxo usando pressão de ar (Figura 25) (3). À medida que as células passam pela câmara de fluxo, são envolvidas por um fluido de baixa pressão. Este fluxo externo cria um fluxo laminar que resulta num alinhamento individual das células. Este processo tem como nome focalização hidrodinâmica. Um feixe de laser passa através de cada célula à medida que estas fluem através da câmara. A dispersão de luz direta ou FSC (*Forward Scatter*) é proporcional ao tamanho da célula, e a dispersão em ângulo reto ou SSC (*Side Scatter*) está relacionada com a granularidade da célula e irregularidade nuclear. As células podem ainda ser marcadas com determinados fluorocromos (3).

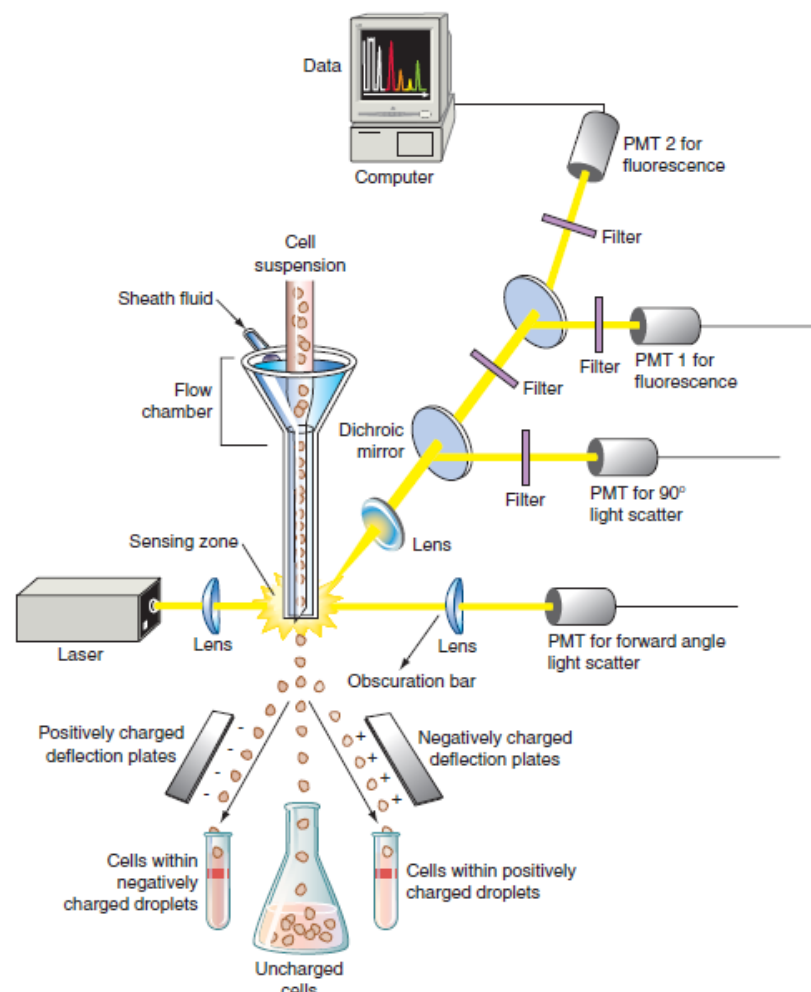


Figura 25. Componentes do um citômetro de fluxo (3).

8.1.3 Impedância

A medição de impedância elétrica é baseada na mudança da resistência elétrica quando uma partícula num líquido condutor passa por essa abertura. À medida que uma célula passa pela abertura, ocluindo-a parcialmente, a impedância elétrica aumenta, produzindo um pulso de voltagem, cujo tamanho é proporcional ao tamanho da célula. O número de pulsos é diretamente relacionado à contagem de células (3).

8.1.4 SP-50 e CellaVision® DM96

Outro estudo hematológico importante é o estudo da morfologia das células sanguíneas. O exame microscópico de um esfregaço de sangue fornece informações úteis sobre todos os elementos celulares do sangue.

O SP-50 é um sistema automatizado de preparação e coloração de lâminas que padroniza e acelera a preparação completa de lâminas e o procedimento de coloração de amostras de sangue total humano.

Após a preparação das lâminas pelo SP-50, estas são colocadas no CellaVision® DM96 (Figura 26) que usa tecnologia de análise de imagens digitais para localizar e examinar células no sangue e outros fluidos corporais.

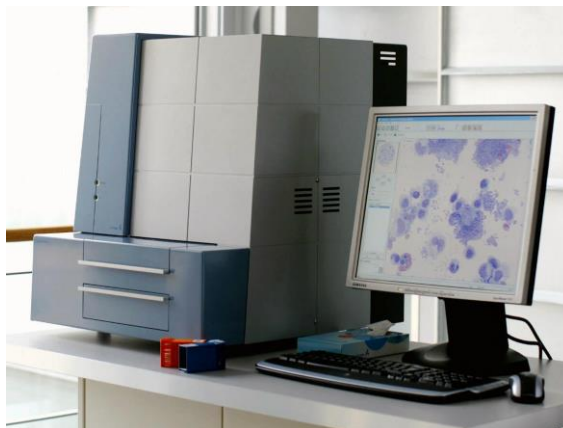


Figura 26. Sistema digital de morfologia celular CellaVision® DM96 da Siemens Healthineers (37).

8.2 Velocidade de sedimentação

A VS é um marcador útil, mas não específico, de inflamação subjacente. Recentemente, a PCR de alta sensibilidade e outros marcadores inflamatórios têm sido usados para detetar ou monitorizar doenças, particularmente doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (3).

A VS mede a distância percorrida pelos eritrócitos durante um determinado período de tempo. Em condições normais, os eritrócitos tendem a separar-se

reciprocamente devido à presença de carga elétrica negativa. Quando a composição proteica do plasma se altera com a produção de proteínas de fase aguda, após um processo inflamatório, a ligação dessas proteínas à superfície das hemácias altera a carga negativa e os eritrócitos ligam-se num padrão *rouleaux*. O valor de VS aumenta aquando do aumento das proteínas de fase aguda, em particular do fibrinogénio (38).

O CUBE 30 touch (Figura 27) é um aparelho que mede a VS de amostras de sangue diretamente do tubo de EDTA em apenas 20 minutos pelo método de referência *Westergren*.



Figura 27. Instrumento CUBE 30 touch da Diesse para a determinação da velocidade de sedimentação (39).

9 Microbiologia

O setor da Microbiologia é responsável pelos estudos bacteriológicos, micológicos e parasitológicos, e também pela análise da urina tipo 2. O setor está dividido em várias secções: cadeia de análise de urinas tipo 2; secção de preparação de sementeiras de urinas e outros produtos biológicos; secção de preparação de antibiogramas; secção com aparelhos de identificação e de análise dos antibiogramas e uma secção de validação de resultados.

Durante 3 semanas (cerca de 120 horas), foi possível passar pelas diferentes secções do setor e participar e visualizar diferentes etapas: colocação de tubos de urina tipo 2 nos autoanalisadores; visualização do processo de sementeira de vários produtos biológicos e realização de uma sementeira; visualização e participação na identificação dos microrganismos por MALDI-TOF; visualização da preparação dos antibiogramas e visualização e interpretação de resultados de sementeiras e antibiogramas.

Os estudos bacteriológicos e micológicos seguem uma sequência de testes semelhante. Após a sementeira e incubação, há uma interpretação do crescimento em placa: são contabilizados o nº de colónias, avaliando se a cultura é pura ou polimicrobiana

e a sua significância clínica. Se a cultura é polimicrobiana, mas possui predomínio de alguma bactéria que poderá ter interesse clínico, esta deverá ser isolada. Procede-se à identificação dos microrganismos e do respetivo antibiograma, se recomendado.

Após a obtenção dos resultados de identificação e antibiograma, é necessário fazer a validação de resultados. Coloca-se o nº de colónias ($<10^3$, 10^4 , $>10^5$), se a cultura é pura ou polimicrobiana (com ou sem predomínio) e verifica-se o antibiograma, histórico do doente e o sedimento urinário.

O foco desta secção do relatório cairá principalmente no estudo bacteriológico, visto que este é o estudo mais comum na área de microbiologia.

9.1 Exame cultural

Os meios de cultura são selecionados de modo a fornecer as condições ideais para o crescimento de agentes patogénicos comumente encontrados em tipos específicos de amostras. Assim, os meios escolhidos podem incluir meios seletivos e diferenciais, além do meio de enriquecimento padrão.

As culturas bacterianas são geralmente incubadas a 35°C e podem ser examinadas inicialmente após 18 a 24 horas de incubação. Algumas bactérias exigem a adição de 5% a 10% de dióxido de carbono ou um sistema de cultura anaeróbio (3).

As placas ou tubos de culturas micológicas devem ser incubados a 25°C - 30°C . Embora não seja necessário incubar placas ou tubos paralelos a 37°C para recuperação da fase leveduriforme de fungos dimórficos, nos casos em que há forte suspeita de fungos endémicos, a incubação a essa temperatura deve ser considerada. A maioria dos fungos cresce dentro de um período de incubação de 2 semanas, mas alguns fungos podem demorar até 28 dias (3).

9.2 Coloração de Gram

O exame direto de uma amostra com coloração de Gram fornece informações que ajudam a avaliar a qualidade da amostra e a valorizar os organismos do exame cultural. Em amostras como a expectoração, a qualidade da amostra poderá ser averiguada pelo maior número de leucócitos e o menor número de células presentes em coloração de Gram. Organismos semelhantes em esfregaços e culturas contribuem para aumentar a significância clínica dos resultados obtidos (3).

Uma alíquota da amostra é colocada numa lâmina microscópica limpa. O conteúdo da amostra presente na lâmina é deixado secar e fixado com calor suave. A amostra é corada com reagentes de coloração de Gram (violeta de cristal, iodo de Gram, álcool e safranina). Os organismos que possuem parede celular gram-positiva resistem à

descoloração com metanol e retêm a cor roxa do corante violeta cristal. Por outro lado, os organismos gram-negativo são descolorados pelo metanol e corados de vermelho pela contracoloração de safranina (3).

9.3 Coloração de Ziehl-Neelsen

A coloração de Ziehl-Neelsen é usada para identificar micobactérias e outros organismos ácido-resistentes. Os organismos são corados com carbolfucsina básica e resistem à descoloração com soluções ácido-alcálinas, enquanto o fundo é contrastado com azul de metileno. Os organismos aparecem em vermelho contra um fundo azul-claro (Figura 28) (40).

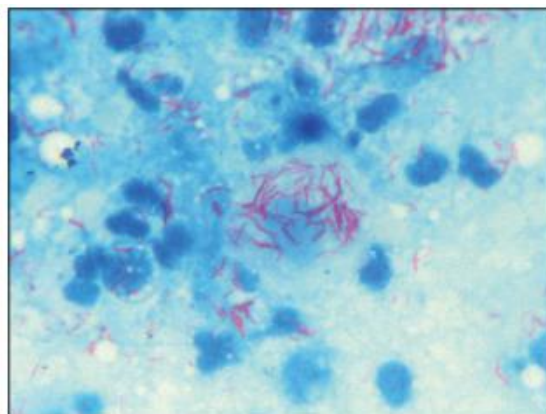


Figura 28. Bacilos ácido-resistentes corados com coloração de Ziehl-Neelsen (41).

9.4 Identificação

9.4.1 MALDI-TOF

A espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) é uma poderosa e rápida abordagem para determinar sequências de RNA, DNA e proteínas. O DNA ou RNA é inserido no instrumento, ionizado e fragmentado, os fragmentos são separados com base na sua razão carga-massa e a sequência nucleotídica é determinada pela análise da massa dos fragmentos ionizados. A comparação de genes específicos (e.g. RNA 16S) ou sequências amplificadas por PCR com um banco de sequências de genes pode permitir a detecção e identificação microbiana rápida e a discriminação de estirpes específicas (41). A espectrometria de massa MALDI-TOF também usa o peso molecular para distinguir diferentes proteínas.

A identificação por MALDI-TOF é realizada através de aparelhos como o MALDI-TOF microflex® (Figura 29).



Figura 29. Sistema MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) microflex® da Bruker (42).

9.5 Antibiógramas

Os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* ou antibiógramas são valiosos para a seleção de agentes terapêuticos ativos contra o patógeno. Duas formas gerais de antibiógramas são realizadas no laboratório clínico: testes de diluição em caldo e testes de difusão em agar (40).

Para testes de diluição em caldo, diluições seriadas de um antibiótico são preparadas num meio com nutrientes e inoculadas com uma concentração padronizada do microrganismo. Após a incubação, a concentração mais baixa de antibiótico que é capaz de inibir o crescimento da bactéria é referida como a concentração inibitória mínima (CIM) (40).

Os testes de diluição em caldo foram originalmente realizados em tubos de ensaio. Sistemas preparados comercialmente estão agora disponíveis onde as diluições de antibióticos são preparadas em placas de microtitulação e a inoculação e interpretação das CIMs são automatizadas (40). No laboratório Unilabs Porto Central, as placas de microtitulação são incubadas e interpretadas através de aparelhos como MicroScan WalkAway 96 *plus* (Figura 30).



Figura 30. Sistema MicroScan WalkAway 96 *plus* da Beckman Coulter para a realização de antibiogramas (43).

Para os testes de difusão em ágar, é feita uma sementeira de uma concentração padronizada do microrganismo e, em seguida, discos ou tiras de papel impregnados com antibióticos são colocados na superfície do ágar. O tamanho da área de inibição corresponde à atividade do antibiótico, quanto mais suscetível o organismo for ao antibiótico, maior será a área de crescimento inibido (40).

O método manual com discos de difusão em ágar é realizado aquando de dúvidas e erros (e.g. poços alternados) nos antibiogramas por diluição em caldo.

9.6 Infecções bacteriológicas e meios de cultura

9.6.1 Infecções do trato respiratório inferior

As amostras do trato respiratório inferior são sujeitas a um exame direto, através da observação de lâminas com coloração de Gram e coloração de Ziehl-Neelsen. O número de leucócitos e de células observado ao microscópio é de extrema importância para verificar se a colheita foi realizada corretamente e valorizar os resultados do exame cultural.

A infecção pode ocorrer em diversos locais do trato respiratório inferior, e diferentes bactérias podem ser a causa da infecção consoante o local (Tabela 20). As sementeiras de amostras do trato respiratório inferior são feitas em meio gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey.

Tabela 20. Locais afetados pela infecção do trato respiratório inferior e exemplos de bactérias responsáveis pela infecção.

	Bactérias (40)
Bronquite	<i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Empiema	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> do grupo A, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Pneumonia	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>

9.6.2 Gelose sangue

Os meios de gelose sangue são muito usados em laboratórios clínicos. O meio contém dois componentes primários - um meio basal (e.g. infusão de cérebro e coração) e sangue (e.g. ovelha). Vários outros suplementos podem ser adicionados para ampliar a gama de organismos que podem crescer no meio (40).

O meio de gelose sangue usado é recomendado para a determinação das propriedades hemolíticas das colônias e crescimento de organismos fastidiosos. A β -hemólise (Figura 31, esquerda) aparece como uma zona clara ao redor da colônia e a α -hemólise (Figura 31, direita) aparece como pigmentação esverdeada e uma zona estreita de hemólise parcial ao redor da colônia (40).

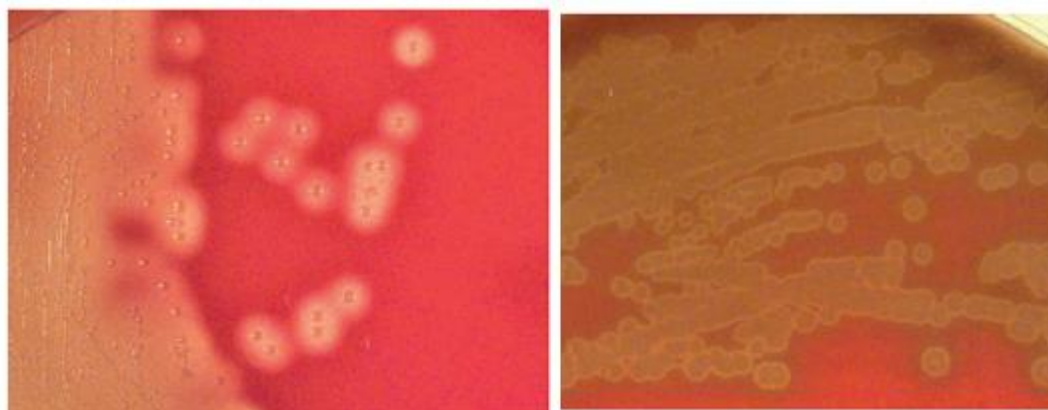


Figura 31. β -hemólise por *Streptococcus pyogenes* em meio gelose sangue (esquerda); α -hemólise por *Streptococcus mitis* em meio gelose sangue (direita). Adaptado de Murray et al. (40).

9.6.3 Gelose chocolate

A gelose chocolate é um meio de agar sangue modificado. Quando o sangue ou hemoglobina é adicionado ao meio basal aquecido, este fica castanho (40). O aquecimento rompe as células sanguíneas libertando nutrientes no meio, incluindo aqueles requeridos por *Haemophilus* spp. como o fator V e fator X (44). Este meio suporta o crescimento da maioria das bactérias, incluindo algumas que não crescem em agar sangue (*Haemophilus* spp. e algumas estirpes patogénicas de *Neisseria* spp.) (40).

9.6.4 MacConkey

O meio MacConkey é um meio seletivo para bactérias gram-negativas e diferencial para bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose. Os sais biliares e o cristal violeta inibem as bactérias gram-positivas. As bactérias que fermentam a lactose produzem um ácido que precipita os sais biliares e causa uma cor vermelha (Figura 32, A).

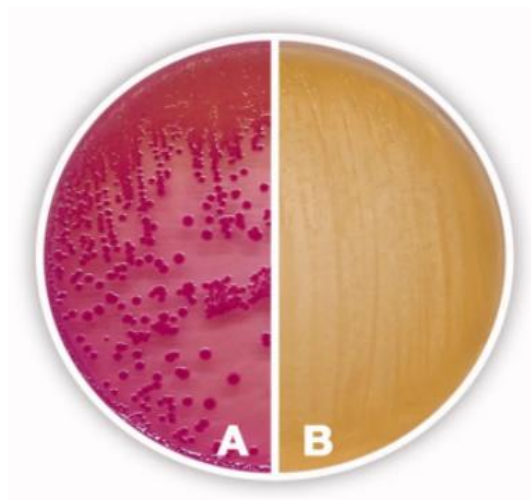


Figura 32. Meio de MacConkey (45).

A – fermentação da lactose. B – não-fermentação da lactose.

9.6.5 Infecções do trato urinário

A sementeira de urina de 2º jato é feita em meio CLED (*Cystine Lactose Electrolyte Deficient*), recomendado para o estudo bacteriológico urinário. O exame cultural é auxiliado pela realização do exame do sedimento urinário, com avaliação do número de leucócitos e células epiteliais de descamação.

Um elevado número de leucócitos na amostra de urina é indicativo de uma infeção, por outro lado, um elevado número de células epiteliais de descamação poderá indicar uma má colheita da amostra.

Aquando de um crescimento bacteriano negativo e uma leucocitúria acentuada, é realizada uma nova sementeira da amostra num meio de gelose sangue. Se não ocorrer crescimento de colónias após a nova sementeira, a amostra de urina é considerada estéril.

Os principais organismos responsáveis por infeções do trato urinário são bactérias da família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp.), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e Estafilococos coagulase-negativos (Tabela 21) (40).

Tabela 21. Principais bactérias responsáveis por infeções do trato urinário e suas características microscópicas (coloração de Gram) e macroscópicas (aparência em meio CLED).

	GRAM	Aparência em CLED (46)
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos de Gram-negativo	Colónias amarelas opacas Estirpes não fermentadores de lactose azuis
<i>Proteus</i> spp.	Bacilos de Gram-negativo	Colónias azuis translúcidas
<i>Klebsiella</i> spp.	Bacilos de Gram-negativo	Colónias mucoides amarelas a azuis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos de Gram-negativo	Colónias verdes com superfície típica mate e periferia irregular
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos de Gram-positivo	Colónias amarelas de pequena dimensão (0,5 mm de diâmetro)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos de Gram-positivo	Colónias amarelas de pequena dimensão (0,75 mm de diâmetro)
Estafilococos coagulase-negativos	Cocos de Gram-positivo	Colónias amarelo-pálidas a brancas

9.6.6 CLED

O agar CLED é um meio diferencial com azul de bromotimol, um indicador de pH que diferencia fermentadores de lactose (meio torna-se amarelo) de não fermentadores (Figura 33) (46).



Figura 33. Meio CLED com crescimento bacteriano de um organismo fermentador de lactose (47).

9.6.7 Infecções genitais

Os exsudados cervico-vaginal e uretral são semeados em meio de gelose sangue e meio de gelose chocolate VCAT (com vancomicina, colistina, anfotericina B, trimetoprima). Adicionalmente ao exame cultural, é realizada uma coloração Gram para auxiliar na identificação e validação dos resultados (40).

A vaginose bacteriana é caracterizada por mudanças dramáticas na flora vaginal, com uma diminuição do número de lactobacilos e um crescimento elevado de bactérias como a *Gardnerella vaginalis*, um cocobacilos de Gram variável (48). A infecção por *Gardnerella vaginalis* é caracterizada pela presença de *clue cells* na coloração Gram, células epiteliais cobertas de cocobacilos (20).

O meio de Gelose Chocolate VCAT é um meio seletivo usado para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae*, bactéria sexualmente transmissível e responsável por uretrites e cervicites (40, 49). Outras bactérias responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis como a *Chlamydia trachomatis* (clamídia) e a *Treponema pallidum* (sífilis) não são cultiváveis, sendo o diagnóstico feito por testes serológicos e PCR.

Streptococcus agalactiae (*Streptococcus* do grupo B) é um cocos de Gram-positivo colonizador do trato genital feminino, responsável por doença neonatal (bacteremia, pneumonia, meningite). A identificação de mulheres grávidas portadoras de alto risco e o seu tratamento com várias formas de profilaxia antibiótica são importantes para prevenir infecções por *Streptococcus agalactiae* em recém-nascidos durante o parto (20, 40, 50). Os *Streptococcus* do grupo B crescem em meio de gelose sangue, com colônias cinzas a brancas cercadas por uma zona fraca de β -hemólise. O meio chromID® Strepto B também pode ser usado para auxiliar na identificação por possuir substratos cromogênicos que coloram as colônias de *Streptococcus agalactiae* de rosa pálido a vermelho (Figura 34) (50, 51).



Figura 34. Meio chromID® Strepto B para rastreio de *Streptococcus* do grupo B (51).

9.6.8 Infecções gastrointestinais

As amostras de fezes são cultivadas em meio CAMPY, meio XLD (*Xylose-Lysine Deoxycholate*) sem e com caldo e MacConkey. As bactérias pesquisadas nas amostras de fezes são *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. e *Campylobacter* spp. responsáveis por gastroenterites (40).

9.6.9 Meio XLD

O meio XLD é um agar seletivo usado para a detecção de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em culturas entéricas. O desoxicolato de sódio presente no meio inibe o crescimento da maioria das bactérias não patogénicas. As bactérias não patogénicas fermentam lactose, sacarose ou xilose, produzindo colónias amarelas (Figura 35, C) (40).

Shigella spp. não fermenta os carboidratos, então as colónias aparecem vermelhas. A *Salmonella* spp. fermenta a xilose, mas também descarboxila a lisina, isso neutraliza os produtos da fermentação ácida. Como a maioria das salmonelas produz sulfeto de hidrogénio a partir de tiosulfato de sódio, as colónias ficam pretas na presença de citrato férrico de amónio (Figura 35, B), diferenciando assim a *Salmonella* spp. da *Shigella* spp. (40).

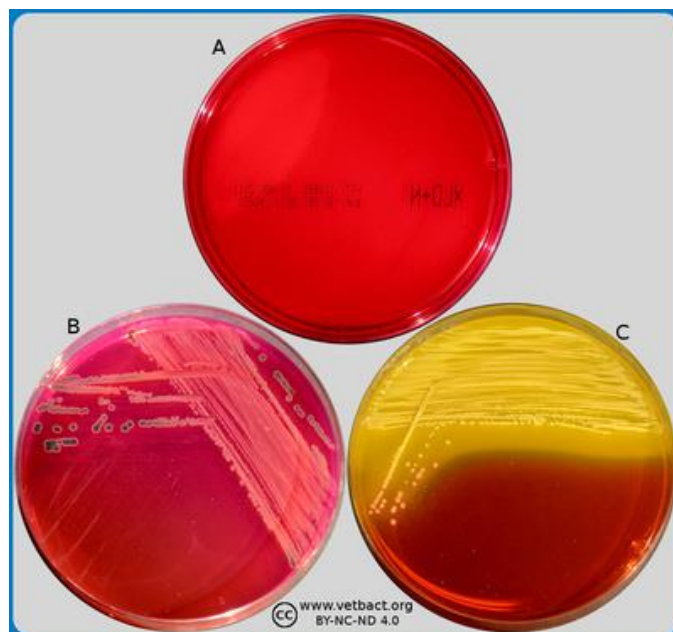


Figura 35. Meio XLD (52).

A – placa sem cultura bacteriana. B – Cultura de *Salmonella* spp. com colônias avermelhadas e centro negro. C – Cultura de *E. coli* fermentadora dos carboidratos (52).

9.6.10 Meio CAMPY

O meio CAMPY é usado para o isolamento seletivo de *Campylobacter* spp., o crescimento da flora fecal normal é inibido neste meio.

O crescimento de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. upsaliensis* requer uma atmosfera microaerofílica (5-7% de oxigênio, 5-10% de dióxido de carbono), numa temperatura de incubação elevada (42°C), e em meio de agar seletivo para suprimir bactérias entéricas não patogênicas. Desta forma, o meio seletivo deve conter sangue ou carvão para remover os radicais tóxicos de oxigênio, e antibióticos para inibir o crescimento de organismos contaminantes (40).

9.6.11 Outros produtos

Para além dos produtos biológicos já referidos, o laboratório analisa outros produtos de elevada importância (Tabela 22).

Tabela 22. Diferentes produtos biológicos analisados na microbiologia e respectivos método de exame direto e meios de cultura.

	Exame direto	Exame culturais
Trato respiratório superior		
Exsudatos orofaríngeos		Gelose sangue (CNA)
Exsudatos auriculares	Gram	Gelose sangue, Gelose chocolate, CLED
Exsudatos oculares	Gram	Gelose sangue, Gelose chocolate, MacConkey, Caldo soja
Pele e tecidos moles		
Feridas superficiais	Gram	Gelose sangue, MacConkey, MSA
Feridas profundas	Gram	Gelose sangue, MacConkey, Caldo soja
Sangue		
Hemoculturas positivas	Gram	Gelose sangue
Exsudato de cateter	Gram	Gelose sangue, MSA
Ponta de cateter		Gelose sangue
Líquidos das cavidades naturais		
Líquido peritoneal, líquido pleural, líquido pericárdico, LCR	Gram	Gelose sangue, Gelose chocolate, MacConkey, Caldo soja
Líquido sinovial	Gram	Gelose sangue, Gelose chocolate, Caldo soja

CLED – *Cystine Lactose Electrolyte Deficient*; CNA – *Columbia NaladixicAcid Agar*; LCR – Líquido Cefalorraquidiano; MSA – *Mannitol Salt Agar*.

9.6.12 MSA

O MSA (*Mannitol Salt Agar*) é um meio seletivo usado para o isolamento de estafilococos. Os estafilococos podem crescer na presença de uma alta concentração de sal, e o *S. aureus* pode fermentar o manitol, produzindo colónias de cor amarela neste agar (Figura 36) (40).



Figura 36. Colónias amarelas de *S. aureus* em MSA (*Mannitol Salt Agar*) (53).

9.7 Micologia

O exame micológico faz-se por exame microscópico direto e por exame cultural em meio Sabouraud. O meio Sabouraud é um meio enriquecido composto por digestões de caseína e tecido animal suplementado com glicose é usado para o isolamento de fungos. Ao reduzir o pH do meio e adicionar antibióticos (e.g. cloranfenicol) para inibir as bactérias, o meio torna-se seletivo para fungos (40).

9.8 Parasitologia

O exame parasitológico de fezes e outros produtos biológicos é feito através do exame microscópico direto. As amostras de fezes são preparadas através do sistema ParasiTrap® no setor de triagem.

Alguns parasitas visualizados ao microscópio ao longo do estágio foram *Giardia lamblia* em amostras de fezes e *Trichomonas vaginalis* em exsudados urogenitais.

9.9 Virologia

A maioria dos exames de virologia realizados no Unilabs Porto Central são feitos através de métodos serológicos no setor Core, com a determinação de antígenos virais e anticorpos contra antígenos virais por quimioluminescência (Tabela 23).

Tabela 23. Marcadores serológicos virais e respetivo instrumento analítico.

	Análises	Instrumento
Vírus da hepatite A	Anticorpos IgG, Anticorpos totais	Atellica® IM Analyzer
Vírus da hepatite B	Anti-HBe, Anti-HBs, Anti-HBc, HBc IgM HBe, HBs	
Vírus da hepatite C	Antigénio	
VIH	Anticorpos e antígenos	
Vírus da rubéola	Anticorpos IgM, Anticorpos IgG	
SARS-CoV-2	Anticorpos IgG	

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana; HBe – Antigénio e do vírus da hepatite B; HBs – Antigénio s; HBc – Antigénio c; Ig – Imunoglobulina.

10 Urina tipo II

As amostras de urina tipo II são analisadas no setor da Microbiologia. O exame de urina básico de rotina consiste em três partes: exame macroscópico/físico (cor, aspeto, odor), análise química e exame de sedimento urinário.

10.1 Análise química da urina

As tiras de reagentes são o principal método usado para o exame químico da urina. Embora a leitura das tiras tenha sido tradicionalmente feita manualmente, agora estão disponíveis instrumentos automatizados que aspiram uma quantidade precisa de urina e leem as reações químicas na tira reagente por refletância (3).

A cadeia de análise da urina tipo II possui 3 aparelhos UC-3500 (Figura 37) para a análise química automática da urina. As tiras de testes realizam as seguintes análises: urobilinogénio, eritrócitos, proteínas, glicose, corpos cetónicos, bilirrubina, nitritos, leucócitos e pH (3).



Figura 37. Analisador automatizado de análise química de urina UC-3500 da Sysmex Europe (54).

10.2 Sedimento urinário

No sedimento urinário podem ser observados elementos celulares (células epiteliais do trato urinário, leucócitos e eritrócitos), cilindros (*e.g.* hialinos, granulosos, cerosos), cristais (*e.g.* ácido úrico, oxalato de cálcio) e organismos (*e.g.* bactérias) (3).

Os elementos do sedimento urinário são analisados por citometria de fluxo por fluorescência em aparelhos UF-5000 (Figura 38) e microscopia automatizada em aparelhos UD-10 (Figura 39).



Figura 38. Citômetro de fluxo UF-5000 da Sysmex Europe (55).



Figura 39. Dispositivo de imagem digital de partículas de urina totalmente automatizado UD-10 da Sysmex Europe (56).

11 Conclusão

O estágio na Unilabs Porto Central permitiu-me consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do ano letivo e também adquirir novos conhecimentos na área das análises clínicas, principalmente conhecimento práticos dos diversos métodos e instrumentos analíticos presentes no laboratório.

Foi possível ter uma visão completa e robusta do trabalho realizado num contexto profissional de um laboratório de análises clínicas, desde a receção de amostras e verificação da sua qualidade na pré-analítica até à validação de resultados realizada em todos os setores. Na fase analítica, foi possível visualizar e experienciar o papel de um técnico de análises clínicas nos vários setores, sendo-me permitido ajudar na manutenção do bom funcionamento dos analisadores, com a programação de controlos de qualidade e calibrações, manuseamento de amostras e substituição de reagentes, fluídos e outros materiais.

Ao longo do estágio, a importância do trabalho realizado no laboratório de análises clínicas foi enfatizada, sendo que estes laboratórios têm um papel fundamental nos cuidados de saúde, fornecendo aos médicos e outros profissionais de saúde informações que auxiliam na prevenção, diagnóstico e monitorização de doença. Na Unilabs, todos os técnicos têm atenção à qualidade dos resultados obtidos e estão cientes da sua importância, pois por de trás de cada análise há um paciente.

Assim, agradeço a disponibilidade da Unilabs e de todos os técnicos e colaboradores dos diferentes setores do laboratório para me receberem e acompanharem durante o estágio.

12 Referência bibliográficas

1. Despacho n.º 10009/2019. Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas. 2019.
2. Dasgupta A, Wahed A. Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. 1 ed: Elsevier; 2014.
3. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22 ed: Saunders; 2011.
4. "Westgard Rules" and Multirules. Disponível em <https://www.westgard.com/mltirule.htm> [Acedido em 21/04/2022]
5. RIQAS Brochure. 2019.
6. UK NEQAS Compendium II. 2018.
7. Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, Picheth G, Guidi GC. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. Scand J Clin Lab Invest. 2017; 77(3): 153-63.
8. AutoMate 2500 Family. Disponível em <https://www.beckmancoulter.com/products/automation/automate-2500-family-sample-processing-systems> [Acedido em 02/03/2022]
9. Aptio Automation Technical Specifications. Siemens Healthcare Diagnostics. 2019.
10. Aptio Automation Disponível em <https://www.siemens-healthineers.com/laboratory-automation/systems/aptio-automation> [Acedido em 24/04/2022]
11. Atellica Solution. Siemens Healthcare Diagnostics. 2018.
12. Atellica Solution Immunoassay & Clinical Chemistry Analyzers. Disponível em <https://www.siemens-healthineers.com/pt/integrated-chemistry/systems/atellica-solution-analyzers> [Acedido em 24/04/2022]
13. Barron AR. Physical Methods in Chemistry and Nano Science. 2012.
14. Luminometer Disponível em <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/knowledge/glossary/luminometer/> [Acedido em 25/04/2022]
15. Capillary electrophoresis system CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING Disponível em <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/sebia/product-69959-442582.html> [Acedido em 04/05/2022]
16. API 5000™ System Hardware Guide | AB SCIEX. 2010.
17. Operating Manual PlasmaQuant MS product family. Analytik Jena GmbH. 2020.
18. Mass spectrometry Disponível em <https://sisu.ut.ee/heritage-analysis/52-mass-spectrometry> [Acedido em 25/04/2022]
19. Nexera Series - Modular UHPLC/HPLC Systems. Disponível em <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/nexera/nexera-uhplc-system.html> [Acedido em 24/04/2022]

20. Jameson L, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 20 ed: McGraw-Hill Education; 2018.
21. Norma da Direcção-Geral da Saúde, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, Nº 002/2011, 14/01/2011.
22. Norma da Direcção-Geral da Saúde, Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Dislipidemias no Adulto, Nº 066/2011, 30/12/2011 atualizada a 26/02/2015.
23. Norma da Direcção-Geral da Saúde, Abordagem Terapêutica das Dislipidemias no Adulto, Nº 019/2011, 28/09/2011 atualizada a 11/05/2017.
24. Como ler os resultados das análises clínicas mais comuns? Unilabs. Disponível em <https://blog.unilabs.pt/exames-medicos/resultados-das-analises-clinicas/> [Acedido em 01/05/2022]
25. Test Catalog Disponível em <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog> [Acedido em 12/05/2022]
26. What is FIT? . Disponível em <https://www.eiken.co.jp/en/ourfields/gastroenterology/whatisfit/> [Acedido em 08/05/2022]
27. Programa de Rastreio do Cancro do Cólon e Reto. Disponível em <https://www.arsnorte.min-saude.pt/ratreios/cancro-do-colon-e-recto/> [Acedido em 08/05/2022]
28. EUROLINE-FOOD Profile 216 (IgG) Test instruction. EUROIMMUN; 2017.
29. EUROBlotOne. Disponível em <https://www.euroimmun.com/products/automation/immunoblot/euroblotone/> [Acedido em 09/05/2022]
30. SISTEMA DE TESTE HEp-2000® IgG FLUORESCENTE ANA-Ro. Immuno Concepts 2018.
31. ANTINUCLEAR ANTIBODIES HEp-2 (ANA-HEp-2). A. Menarini Diagnostics. 2019.
32. Zenit PRO. Disponível em <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/produtos-para-laborat%C3%B3rio/autoimunidade/zenit-pro/caracter%C3%ADsticas> [Acedido em 10/05/2022]
33. Immunocap 250 Disponível em <http://diagnocel.com.br/diagnostico-in-vitro/immunocap-250/> [Acedido em 10/05/2022]
34. Autoantibody Test System. A. Menarini Diagnostics. 2017.
35. ORTHO AutoVue® Innova. Ortho Clinical Diagnostics
36. XN-1000 Pure Disponível em <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/xn-1000-pure.html> [Acedido em 12/05/2022]
37. CellaVision DM96 Digital Cell Morphology System. Disponível em <https://www.siemens-healthineers.com/br/hematology/systems/cellavision-dm96-digital-cell-morphology-system> [Acedido em 12/05/2022]
38. CUBE 30 touch User Manual. Diesse 2018.
39. Cube 30 touch. Disponível em <https://www.diesse.it/en/products/cube-30-touch/> [Acedido em 12/05/2022]
40. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 8 ed: Elsevier; 2016.

41. Prasad CSR, Harendra Kumar ML, Narasimha A. Negative staining of mycobacteria - A clue to the diagnosis in cytological aspirates: Two case reports. *Ann Trop Med Public Health*. 2011; 4(2).
42. microflex™ LRF | Bruker Daltonics. 2017.
43. MicroScan WalkAway plus System | Beckman Coulter Disponível em <https://www.beckmancoulter.com/en/products/microbiology/microscan-walkaway-plus-system> [Acedido em 13/05/2022]
44. Oxoid Columbia Agar with Chocolate Horse Blood. Thermo Scientific. 2020.
45. MacConkey Agar | Principle | Preparation | Interpretation. Disponível em <https://microbiologie-clinique.com/macconkey-agar.html> [Acedido em 13/05/2022]
46. Oxoid C.L.E.D. Agar IFU. Thermo Fisher Scientific 2020.
47. CLED AGAR Disponível em <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PO5009A?SID=srch-hj-PO5009A> [Acedido em 13/03/2022]
48. Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE. Role of Gardnerella vaginalis in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: A Conceptual Model. *J Infect Dis*. 2014; 210(3): 338-43.
49. Oxoid Chocolate G.C. Selective Agar Product Specification. Thermo Fisher Scientific 2020.
50. Filkins L, Hauser J, Robinson-Dunn B, Tibbetts R, Boyanton B, Revell P. American Society for Microbiology Provides 2020 Guidelines for Detection and Identification of Group B Streptococcus. *J Clin Microbiol*. 2020; 59(1): 1-22.
51. chromID Strepto B Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/chromid-strepto-b> [Acedido em 21/03/2022]
52. Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar). Disponível em <https://www.vetbact.org/displayextinfo/46> [Acedido em 13/05/2022]
53. Mannitol Salt Agar: Uses, Results. Disponível em <https://microbeonline.com/mannitol-salt-agar-msa-composition-uses-and-colony-characteristics/> [Acedido em 13/05/2022]
54. UC-3500 Disponível em <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/uc-3500.html> [Acedido em 13/05/2022]
55. UF-5000 Disponível em <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/uf-50004000.html> [Acedido em 13/05/2022]
56. UD-10. Disponível em <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/ud-10.html> [Acedido em 13/05/2022]