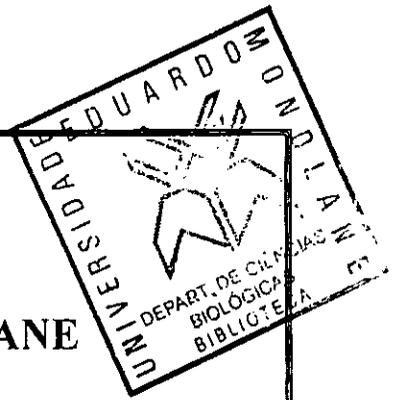


**BIO 744**



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**



*Faculdade de Ciências*  
*Departamento de Ciências Biológicas*

**(RELATÓRIO DE ESTÁGIO)**  
**TRABALHO DE CULMINAÇÃO DO CURSO**

**Técnicas Laboratoriais de Análise de Sangue  
Desenvolvidas na secção de Hematologia do  
Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital  
Central de Maputo**

**Autor: José João Tандаucane**



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

*Faculdade de Ciências*  
*Departamento de Ciências Biológicas*

**(RELATÓRIO DE ESTÁGIO)**  
**TRABALHO DE CULMINAÇÃO DO CURSO**

**Técnicas Laboratoriais de Análise de Sangue  
Desenvolvidas na secção de Hematologia do  
Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital  
Central de Maputo**

**Supervisora:**

Dra. Cristina Beatriz

**Autor:**

José João Tандаucane

**Orientadora do estágio**

Tec<sup>a</sup>. Rosa M. Cardoso

Maputo, Dezembro de 2007

## **AGRADECIMENTOS:**

Aos meus Pais, João Tандаucane e Carlota Wingane, por me terem instruído o meu primeiro ABC e pelo incansável apoio, estímulo e total compreensão da minha mãe.

Aos meus tios e irmãos, especialmente António Tандаucane e Roberto João Tандаucane, pela ajuda moral, financeira e constante incentivo durante todo este tempo, mostrando-se sempre dispostos a apoiarem-me nos momentos de extrema dificuldade.

À minha supervisora Dra. Cristina Beatriz, que ao longo do tempo se mostrou, para além de ser uma excelente professora, uma grande amiga pela incansável ajuda no delineamento deste trabalho e suas devidas correcções. Obrigado pelo seu carinho e dedicação, sem os quais seria impossível ter chegado até aqui.

À minha orientadora do estágio, Tec<sup>a</sup>. Rosa M. Cardoso, pela sua constante disposição, empatia, orientação e conselhos ao longo deste trabalho.

À todo pessoal do Laboratório de Análises Clínicas do HCM, especialmente ao pessoal da secção Hematologia.

Foi indispensável para o sucesso da minha carreira estudantil o apoio moral da Júlia J. Nhamúa, pelo carinho e por me ter deixado fazer parte da sua maravilhosa família, a qual agradeço.

Aos meus grandes amigos, irmãos para todas as horas, Lourenço Zacarias e Moisés Roleque obrigado pela sua amizade.

À todas as demais pessoas que, de forma directa ou indirecta, sempre contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus, por me permitir ter todas essas pessoas sempre ao meu lado.

**DECLARAÇÃO:**

Declaro por minha honra que o presente trabalho foi realizado por mim, como resultado do estágio desenvolvido no Hospital Central de Maputo, e que não foi submetido para outro grau académico. As técnicas apresentadas neste trabalho são executadas no Laboratório de Análises Clínicas do HCM.

Maputo, Dezembro de 2007

José J. Tanduane

(José João Tanduane)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha maravilhosa família e a todos que sempre acreditaram em mim, podendo em especial dedicar os meus queridos pais, irmãos, sem esquecer da Julia J. Nhamúa, a minha alma gemia.

## Resumo

O presente trabalho de estágio foi realizado no laboratório de análises clínicas, do Hospital Central de Maputo. Teve como principais objectivos: adquirir habilidades práticas na execução de técnicas laboratoriais de análises clínicas de sangue e, saber interpretar os resultados dos testes sanguíneos realizados no laboratório de hematologia.

O estágio decorreu entre os meses de Outubro a Dezembro, tendo durado cerca de 8 semanas obedecendo o seguinte programa: uma semana, na secção de colheita das amostras de sangue e, as restantes 7 semanas no próprio na secção de Hematologia.

Durante o período do estágio, a secção de hematologia do LAC do HCM, recebeu e processou cerca de 10.000 amostras, trazidas das enfermarias e consultas externas. O processamento de amostras consistia em análises do Hemograma Completo, análises de Sedimentação de Eritrócitos e Teste de Plasmódio. Foram realizadas 9870 análises de hemograma, 5840 análises de velocidade de sedimentação de eritrócitos e 3200 testes de Plasmódio.

Das amostras requisitadas para análises de hemograma, 1431 (15%), tinham o quadro hematológico normal e 8390 (75%) tinham o quadro hematológico alterado. Das requisitadas para teste de Plasmódio (malária), 5% foram positivas e 95% foram negativas. Não foram analisados os resultados das amostras requisitadas para determinação de velocidade de sedimentação de eritrócitos (VS), pelo facto de, este teste não ser específico e, a sua interpretação deve ser associada a varios factores como: condição clínica, idade, sexo e estado do paciente.

No que concerne aos técnicos do local do estágio, verificou-se o não cumprimento com as regras e normas laboratoriais como: a biossegurança e procedimentos laboratoriais.

Ao longo do estágio, o estudante foi capaz de adquirir conhecimentos sobre os objectivos acima citados.

## Abreviaturas

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média;

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetraacético;

HC - Hemograma Completo;

HCM - Hospital Central de Maputo;

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média;

LAC - Laboratório de Análises Clínicas;

pg – Picograma;

RNA - Ácido Ribonucléico;

TTP - Tempo de Tromboplastina Parcial;

TP - Tempo da Protrombina;

VCM – Volume Corpuscular Médio;

VS - Velocidade de Sedimentação.

## Índice

<b>1. Apresentação e Caracterização da Unidade de Estágio.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Breve historial do Laboratório de análises clínicas do HCM.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Programa de Estágio.....</b>	<b>8</b>
<b>4. Apoio concedido pela unidade de estágio .....</b>	<b>8</b>
<b>5. Revisão bibliográfica .....</b>	<b>8</b>
5. 1 Hemograma Completo (HC).....	10
5. 2 Velocidade de sedimentação dos eritrócitos (VS) .....	13
5. 3 Esfregaço do sangue .....	14
5. 4 Teste de Plasmódio .....	15
<b>6. Definição de problema e justificação do estágio .....</b>	<b>15</b>
<b>7. Objectivos .....</b>	<b>16</b>
<b>8. Actividades desenvolvidas durante o período de estágio .....</b>	<b>16</b>
<b>9. Material e métodos.....</b>	<b>17</b>
9. 1 Material .....	17
9. 2 Métodos.....	18
9. 2. 1 Colheita de amostras de sangue .....	18
9. 2. 2 Hemograma Completo .....	20
9. 2. 3 Velocidade de sedimentação (VS) .....	22
9. 2. 4 Esfregaço do sangue .....	24
9. 2. 5 Contagem manual de reticulócitos.....	26
9. 2. 6 Teste de plasmódio .....	27
<b>10. Resultados e discussão .....</b>	<b>29</b>
<b>11. Prespectivas críticas sobre os processos de produção na unidade de estágio .....</b>	<b>31</b>
<b>12. Conclusão .....</b>	<b>32</b>
<b>13. Recomendações.....</b>	<b>33</b>
<b>14. Bibliografia .....</b>	<b>34</b>

## 1. Apresentação e Caracterização da Unidade de Estágio

O estágio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas (LAC), secção de Hematologia, do Hospital Central de Maputo, sito entre as Avenidas Salvador Allende, Thomas Ndula, Agostinho Neto e Eduardo Mondlane. O HCM é a maior unidade Hospitalar de Moçambique, com serviços de Medicina, Maternidade, Ginecologia, Ortopedia, Cirurgia, Oncologia, Estomatologia entre outros. O LAC do HCM é cosntituído pelas seguintes secções: secção de Colheita de amostras, de Microbiologia, de Bioquímica e de Hematologia. A secção de Microbiologia, está subdividida em: Sorologia, Bacteriologia e Parasitologia (Figura 1).

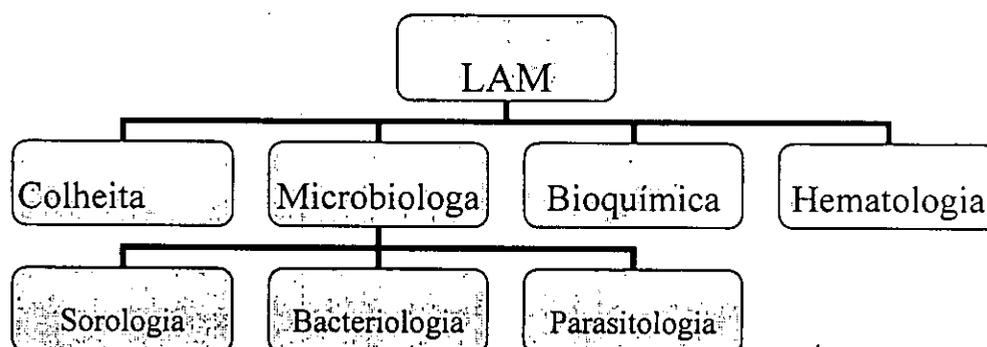


Figura 1. Divisão estrutural do laboratório de análises clínicas do Hospital Central de Maputo

## 2. Breve historial do Laboratório de análises clínicas do HCM

Foi criado em 1908, o primeiro laboratório de Moçambique, em Lourenço Marques, embora sem carácter oficial, que só lhe foi conferido em 1914. Encontrava-se instalado numa das ruas das Maotas e tinha a designação de Gabinete de Bacteriologia e de Parasitologia. Reconhecendo-se o acanhamento das suas instalações, passou a funcionar na segunda enfermaria e mais tarde no Hospital Central Miguel Bombarda (Anónimo, 1956).

Segundo Langa (2006), pelo Decreto nº 34: 417 de 1945, os serviços do Laboratório do Hospital Central Miguel Bombarda passaram a subdividir-se em: Laboratório de Análises Químicas, Bromatológicas e Toxicológicas; Laboratório de Análises Bacteriológicas, Transfusões do Sangue e Anatomia Patológica.

Os serviços do laboratório contribuíram na melhoria dos serviços de saúde na campanha de 1954, de lepra e tuberculose, na identificação das doenças venéreas, raiva e vermes intestinais de varias espécies (Anónimo, 1956). Depois da Independência, em 1975, os serviços de laboratório passaram por várias dificuldades, desde a falta de pessoal especializado, material, manutenção de equipamento laboratorial e défice orçamental para investigação. Nos finais da década 80, os serviços de laboratórios do actual HCM, retomaram as actividades de investigações, actualmente é considerado um dos melhores laboratórios nacionais (Anónimo, 1956).

### **3. Programa de Estágio**

O estágio durou cerca de 8 semanas, decorreu entre os meses de Outubro a Dezembro do ano corrente. O estágio consistiu apenas numa única fase, o estágio final, obedecendo o seguinte cronograma:

- Secção de Colheita de amostras de sangue 18/10/07 a 23/10/07
- Secção de Hematologia 23/10/07 a 8/11/07

### **4. Apoio concedido pela unidade de estágio**

O Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central de Maputo, concretamente, a secção de hematologia, concedeu todo o apoio necessário para realização do presente trabalho, apoio material, técnicos e moral. De salientar o bom ambiente de trabalho proporcionado pelo corpo técnico.

### **5. Revisão bibliográfica**

A hematologia é a parte da biologia que estuda o sangue. A palavra é composta pelos radicais gregos: Haima (de haimatos), que significa "sangue" e lógos, que significa "estudo" (Selig e Nothdurft, 1995).

Em 1628, Robert Bristol descreveu o sangue como um “humor vermelho ardente, cuja função era de nutrir, dar força e cor ao corpo, dispersando-se por veias ao longo de todas parte do mesmo”. A Hematologia (estudo do sangue e seus componentes celulares), teve grandes progressos desde 1628 e, a sua descrição básica ainda não foi alterada (Payton e White, 1995).

Uma pessoa adulta, em média tem aproximadamente 5 litros de sangue circulante que, constitui cerca de 5 a 7% do peso total do seu corpo. Serve para nutrir, oxigenar e defender o organismo dos agentes invasores ou qualquer outro material estranho. É um líquido constituído por uma componente líquida (plasma) e uma sólida (componentes celulares) (Payton e White, 1995; Fischbach e Dunning, 2005).

O plasma, que consiste principalmente de água, iões e proteínas dissolvidas, constitui aproximadamente 60% do volume total do sangue, provem do intestino e do sistema linfático, proporciona um veículo para o movimento das células. A componente celular, que consiste de células brancas (leucócitos), células vermelhas (eritrócitos) e plaquetas (trombócitos), constitui aproximadamente 40% do volume total do sangue, provem da medula óssea, timo e fígado fetal (Payton e White, 1995; Fischbach e Dunning, 2005).

A Hematologia estuda, particularmente, os elementos figurados ou células sanguíneas, a sua produção e os órgãos onde eles são produzidos (órgãos hematopoiéticos): medula óssea, baço e linfonodos. Por outro lado, além de estudar o estado de normalidade dos elementos sanguíneos e dos órgãos hematopoiéticos, estuda também as doenças com eles relacionadas (hemopatias) (Kaja *et al.*, 1993; Fischbach e Dunning, 2005).

Os exames hematológicos são testes de rastreio básico que abordam distúrbios da produção, síntese e função da hemoglobina (Hb) e das células (hematopoiese). Constituem o principal meio de determinação de alguns distúrbios sanguíneos (anemias, leucemias e porfirias, anomalias do sangramento e da coagulação), inflamação, infecção e distúrbios hereditários das hemácias, leucócitos e plaquetas (Fischbach e Dunning, 2005).

Os testes hematológicos examinam o sangue e identificam o tipo e o número das células presentes, especialmente células maduras, avaliam a habilidade de coagulação do sangue e de agregação dos eritrócitos (Payton e White, 1995; Santos e Cunha., 2000).

Os tipos de testes hematológicos realizados rotineiramente na secção de Hematologia, do LAC do HCM são: Hemograma Completo, Velocidade de Sedimentação e Teste de Plamódio.

### **5. 1 Hemograma Completo (HC)**

Hemograma Completo é um teste laboratorial básico que inclui a contagem de leucócitos, hemácias e plaquetas, contagem diferencial de leucócitos, determinação de hemoglobina, hematócrito, índices hematológicos (Payton e White, 1995; Fischbach e Dunning, 2005).

O HC é um teste de rastreio básico e é um dos procedimentos laboratoriais mais solicitados. Os resultados do hemograma fornecem informações de diagnóstico úteis sobre o sistema hematológico e outros sistemas orgânicos, fornecendo um prognóstico de resposta ao tratamento e recuperação do paciente. Consiste em uma série de testes que determinam o número, variedade, percentagem, concentrações e qualidade das células sanguíneas (Fischbach e Dunning, 2005).

Para a realização do HC, muitos laboratórios usam equipamentos automáticos (Payton e White, 1995; Fischbach e Dunning, 2005).

A interpretação dos valores normais, pode variar de um laboratório para outro. Com tudo, os valores estabelecidos por Fischbach (1988), são ainda utilizados, como valores fisiológicos normais ou de referência (Payton e White, 1995; Fischbach e Dunning, 2005).

Contudo, diferentes factores demográficos, sócio económicos, idade, sexo e outros como actividade, sono, condições patológicas, gravidéz (Payton e White, 1995; Wills *et al.*, 2004), refeição e medicamentos usados para o tratamento de varias doenças, estão implicados na alteração do estado hematológico de um indivíduo (Payton e White, 1995; Wills *et al.*, 2004; Fischbach e Dunning, 2005; Litos *et al.*, 2006).

#### **Contagem de leucócitos**

Os leucócitos são divididos em dois grupos principais: granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos recebem esse nome em virtude do núcleo multilobulado e dos grânulos

distintos presentes no citoplasma dos neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Os agranulócitos, que consiste em linfócitos e monócitos, não contêm grânulos distintos e possuem um núcleo não-lobulado. Os leucócitos desempenham o seu principal papel na defesa do organismo contra agentes patogénicos (Fernández, 1996; Guyton e Hall, 2002; Murray *et al.*, 2002; Fischbach e Dunning, 2005; Litos *et al.*, 2006).

A contagem de leucócitos serve como um guia útil da gravidade do processo patológico. Pode se esperar padrões específicos de resposta de leucócitos em vários tipos de doenças, determinados pela contagem diferencial (percentagem dos diferentes tipos de leucócitos) (Fischbach e Dunning, 2005; Hodgson *et al.*, 2005). A contagem de leucócitos e a contagem diferencial, por si sós, têm pouca utilidade como auxiliares de diagnóstico, excepto se os resultados forem relacionados com a condição clínica do paciente, somente assim é possível fazer uma interpretação útil (Fischbach e Dunning, 2005).

### **Contagem de eritrócitos**

A principal função dos eritrócitos é transportar O<sub>2</sub> dos pulmões para os tecidos corporais e transferir o CO<sub>2</sub> dos tecidos para os pulmões. Esse processo é feito por meio da hemoglobina nos eritrócitos, que se combina facilmente com o O<sub>2</sub> e confere ao sangue arterial a sua cor brilhante (Fischbach e Dunning, 2005).

A quantificação dos eritrócitos é uma importante ferramenta na avaliação da anemia ou da policitemia, a quantidade de eritrócitos está diminuída em pacientes com anemia e aumentada em pacientes com policitemia. A anemia é uma anomalia que está relacionada com várias condições como: malária, gravidez, mal nutrição, hemoglobinopatias, deficiência de ferro entre outros, tais como factores genéticos (Fernández, 1996; Guyton e Hall, 2002; Murray *et al.*, 2002; Fischbach e Dunning, 2005).

### **Contagem de plaquetas**

As plaquetas têm uma função importante na coagulação sanguínea, evitando hemorragias. Quando os valores são baixos, a trombocitopenia, pode aparecer em algumas intoxicações, infecções (meningite meningocócica ou febre tifóide), leucemias

e alcoolismo. Os valores elevados têm o nome de trombocitose. Quando as trombose são permanentes geralmente devem-se a uma hiperprodução de plaqueta, no entanto a trombocitose também pode estar associado a policitemia e leucemia, a algumas doenças infecciosas, hemorragias agudas e queimaduras externas (Fernández, 1996; Fischbach e Dunning, 2005).

### **Contagem diferencial de leucócitos ou formula leucocitária**

A contagem de leucócitos circulantes é diferenciada de acordo com os cinco tipos de leucócitos, cada um com uma função específica. A distribuição (número e tipo), de células e o grau de aumento ou diminuição é importante para o diagnóstico (Fischbach e Dunning, 2005; Hodgson *et al.*, 2005).

A contagem diferencial de leucócitos, baseia-se em diferentes componentes químicos de cada tipo celular (Fischbach e Dunning, 2005).

### **Contagem de reticulócitos**

Um reticulócito é um eritrócito jovem, imaturo e anucleado. Contem material reticular (RNA) que cora de cinza-azulado. A contagem de reticulócitos é usada para o diagnóstico diferencial de anemias causadas por insuficiências na medula óssea e por hemorragias ou hemolise, para verificar a efectividade dos tratamentos para anemia perniciosa e para a deficiência de folato e ferro, para avaliar a recuperação da medula óssea na anemia aplásica e para determinar os efeitos de substâncias radioactivas em trabalhadores expostos (Sepa *et al.*, 1993; Payton e White, 1995; Fischbach e Dunning, 2005).

### **Determinação de índices hematológicos**

Os índices hematológicos definem o tamanho e o conteúdo de hemoglobina, consiste na determinação do volume corpuscular médio (VCM), determinação da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e determinação da hemoglobina corpuscular média (HCM) (Sepa *et al.*, 1993; Payton e White, 1995; Fischbach e Dunning, 2005).

VCM - Expressa o volume ocupado por um eritrócito, ou o tamanho do eritrócito, é um melhor índice para classificação de anemias, é medida em micrómetros (Fischbach e Dunning, 2005).

CHCV - Mede a concentração média de hemoglobina nos eritrócitos, é mais útil na monitoração do tratamento de anemias, é medida em g/dL (Fischbach e Dunning, 2005).

HCM - É uma medida do peso médio de hemoglobina por cada eritrócito, é útil para o diagnóstico de pacientes muito anémicos, é medida em pg/célula (Fischbach e Dunning, 2005).

### **Determinação de hemoglobina**

A determinação de hemoglobina é uma parte do HC, usada para o rastreio de doenças associadas à anemia, para determinação da intensidade da anemia, para monitoração da resposta ao tratamento da anemia e para avaliação de eritrocitose (Seppa *et al.*, 1993; Fischbach e Dunning, 2005).

### **Determinação do hematócrito**

O hematócrito é uma parte do HC, que mede indirectamente a massa dos eritrócitos. É uma importante na determinação de anemia ou policitemia (Fischbach e Dunning, 2005).

## **5. 2 Velocidade de sedimentação dos eritrócitos (VS)**

No início deste século, o teste da velocidade de sedimentação dos eritrócitos, foi idealizado para auxiliar no diagnóstico de gravidez, sendo posteriormente, empregado como indicador de doenças inflamatórias ou infecciosas e, até mesmo na condição geral de saúde ou doença (Sharland, 19980 citado por Santos e Cunha, 2000).

Quando ocorre um processo de inflamação, uma grande quantidade de fibrinogênio provoca uma aderência dos eritrócitos. Os eritrócitos formam um agregado chamado "rouleaux" que se estabelece rapidamente. A formação de "rouleaux", também pode ocorrer em associação com algumas perturbações linfoproliferativa em que uma, ou mais.

imunoglobulinas são produzidas em grandes quantidades. A VS é aumentada por qualquer causa, ou foco, de inflamação e, está diminuída em pacientes com anemia, policetemia e com anomalias congénitas do coração (Kirkeby *at al.*, 1989 e Wetteland *at al.*, 1996 citado por Santos e Cunha, 2000; Kanfer e Nicol, 1997), com maior incidência nas mulheres (Santos e Cunha, 2000; Kanfer e Nicol, 1997).

Actualmente, mesmo com a disponibilidade de exames complementares mais sofisticados, o exame de VS continua a ser solicitado com muita frequência pelos reumatologistas, que o utilizam no diagnóstico e acompanhamento clínico de doenças como a artite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico e a doença reumática. A VS também tem utilidades para outros especialistas, incluindo cardiologista, infectologistas e clínicos, além dos profissionais que estão em localidades com recursos laboratoriais mais precários (Santos e Cunha, 2000).

É um teste inespecífico na documentação de processo inflamatório, infeccioso, ou neoplásico. A VS de um indivíduo apresenta um incremento com o aumento da idade. De entre as várias técnicas disponíveis para a determinação do VS, a de referência é a de Westergreen. Neste método, 1,6 ml de uma mistura do sangue venoso com 0,4ml de citrato de sódio são colocados num tubo de ensaio transparente com diâmetro interno de 2,5mm e graduado em mm (Feranández, 1996; Santos e Cunha, 2000).

Valores elevados aparecem em muitas doenças, como já foi dito, não é uma prova específica, não servindo para o diagnóstico, mas para ver a evolução da doença. Na tuberculose, tripanossomiase, gravidez e no cancro, os resultados são, normalmente muito elevados. Valores diminuídos aparecem raramente e são dificilmente mensuráveis (Fernández, 1996; Santos e Cunha, 2000).

### **5.3 Esfregaço do sangue**

O exame de esfregaço do sangue permite determinar variações e anomalias no tamanho, formato, estrutura e morfologia das células sanguíneas, conteúdo de hemoglobina e identificação de alguns parasitas causadores de doenças como: a malária, a filariase e a tripanossomiase (Fernández, 1996; Fischbach e Dunning, 2005).

É útil no diagnóstico de distúrbios hematológicos, como, talassemia, e outras hemoglobinopatias. Este exame também serve como guia para o tratamento e como indicador dos efeitos prejudiciais da quimioterapia e radioterapia. (Fernández, 1996; Fischbach e Dunning, 2005).

#### **5. 4 Teste de Plasmódio**

Existem várias doenças que se assemelham à malária. Só com o resultado da pesquisa da presença dos plasmódios se pode afirmar, se um doente sofre de malária ou não. Uma pessoa pode possuir plasmódios no sangue sem sofrer malária. A informação do laboratório de pesquisa de malária deve, portanto, ser sempre apreciada em conjunto com a informação clínica (MISAU, 1985, 2004; Júnior 2005).

O diagnóstico da malária é feito pela visualização microscópica do plasmódio em exame de esfregaço de sangue (gota espessa ou estendida) numa lâmina de vidro e corado pela técnica de Giemsa ou de Walker (MISAU, 1985, 2004; Júnior, 2006).

Recentemente, novas técnicas científicas estão sendo empregadas para desenvolver diagnósticos simples, eficazes e passíveis de realização fora do laboratório, destacando-se os testes imunocromatográficos rápidos. Contudo, a indicação para utilização destas técnicas ainda é limitada para áreas de difícil acesso ou de baixa prevalência (Júnior, 2006).

#### **6. Definição de problema e justificação do estágio**

Os testes laboratoriais são instrumentos para se obter informações adicionais sobre o paciente. Entretanto, esses testes quando usados em conjunto com os exames físicos, podem confirmar ou fornecer informações úteis sobre a condição de um paciente e sobre a resposta ao tratamento, as quais podem não ser aparentes apenas pela anamnese e exame físico (Fischbach e Dunning, 2005).

A avaliação completa das células sanguíneas é requerida pelos médicos, e outros profissionais da saúde por fornecer informação sobre as células do sangue do paciente e,

ajudar no diagnóstico, determinação da severidade e monitoramento de uma determinada patologia, e permitir prosseguir com exames adicionais.

Nesta época de tecnologias avançadas, os serviços de saúde envolvem muitas disciplinas e especialidades diferentes. Contudo, os clínicos, ou os profissionais de saúde, devem compreender e conhecer outras áreas para além da sua especialidade, isto, inclui a entender a avaliação diagnóstica e os serviços diagnósticos.

Para tal, objectivou-se descrever, saber executar técnicas laboratoriais e saber interpretar os resultados dos testes sanguíneos básicos realizados no LAC, o que levou à opção pelo estágio como o trabalho final de culminação do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

## **7. Objectivos**

### **Objectivo geral**

- Adquirir habilidades técnicas e conhecer os procedimentos utilizados para o processamento e análises de amostras de sangue na secção de hematologia do LAC do HCM.

### **Objectivos específicos**

- Conhecer e saber executar técnicas básicas de análise de sangue (hemograma completo, sedimentação dos eritrócitos e esfregaço do sangue).
- Compreender e saber interpretar os resultados das análises clínicas de sangue.

## **8. Actividades desenvolvidas durante o período de estágio**

Durante o período do estágio, a principal actividade desenvolvida foi o processamento de amostras de sangue. Para além desta, desenvolveu-se diversas outras

actividades podendo destacar, execução de testes rápidos de HIV na secção de microbiologia, colheita de amostras de sangue e preparação de reagentes.

## **9. Material e métodos**

### **9. 1 Material**

#### **Equipamento do laboratório de hematologia**

- 1 Microscópio óptico composto;
- 2 Aparelhos (“*Beckman Culter*”), de hemograma;
- Um computador para pesquisa;
- Agrafadores;
- Cronómetros;
- 1 Aspirador automático.

#### **Material acessório**

- Álcool a 70%;
- Agulhas descartáveis;
- Algodão;
- Bata branca;
- Seringas descartáveis;
- Luvas descartáveis;
- Garrote;
- Suporte de tubos de “*Vacutainer*”;
- Tubos de “*Vacutainer*” descartáveis.
- Eppendorfs;
- Micropipetas;
- Gazes;
- Lâminas de vidro;
- Suportes de Westrgreen;

- Tubos de ensaio;
- Pipetas de Westergreen, de 30 cm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro interior, graduadas de 0 a 200mm.

### **Reagentes**

- Soro fisiológico;
- Solução de Giemsa;
- Citrato de sódio a 3,8%;
- Azul cresil brilhante.

## **9. 2 Métodos**

As amostras processadas na secção de Hematologia do LAC do HCM durante o período de estágio, foram recebidas das enfermarias e consultas externas. As amostras eram recebidas e processadas prontamente tendo em conta o tipo de exame pedido. O processamento de amostras de sangue, consistia em contagem de células sanguíneas (Hemograma Completo), determinação da velocidade de sedimentação de eritrócitos, contagem manual de reticulócitos e teste de Plasmódio. Os dados sobre amostras processadas e dos tipos de exames pedidos, durante o estágio, foram registados e tabelados por dia.

### **9. 2. 1 Colheita de amostras de sangue**

Uma colheita apropriada da amostra presumia uma técnica correcta. O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), foi utilizado como anticoagulante. Os tubos com anticoagulante são invertidos verticalmente com cuidado 7 a 10 vezes após a colheita. Essa técnica assegurava uma completa mistura do anticoagulante com o sangue para evitar a formação de coágulos. O sangue coagulado ou mesmo levemente coagulado invalidava o teste.

Para estudos da coagulação plasmática, como o tempo da protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial (TTP), devia-se permitir o enchimento completo do tubo, a razão sangue/anticoagulante imprópria invalidava os resultados do teste

**Obs:** Os testes de estudo de coagulação plasmática, não são realizados no sector onde o estudante estagiou, por isso, não foram desenvolvidos neste trabalho.

### **Punção capilar (punção percutânea)**

#### **Técnica**

1. Identifica-se correctamente o paciente, numa lâmina ou num microtubo;
2. Desinfecta-se e seca-se o local da punção;
3. Punciona-se a pele com uma lanceta descartável estéril, até uma profundidade máxima de 2mm;
4. Limpa-se a primeira gota de sangue e colhe-se as gotas subsequentes em um microtubo ou na lâmina.

### **Punção venosa (Venopunção)**

#### **Técnica**

1. Rotula-se correctamente o tubo de "Vacutainer", com base na identificação e um número, ou, código atribuído ao paciente na sua requisição.
2. Posiciona-se e aperta-se um torqu沿海 no braço escolhido para produzir congestão venosa;
3. Instrui-se o paciente para fechar a mão, do braço escolhido, e selecciona-se a veia acessível;
4. Limpa-se o local de punção e seca-se-o apropriadamente com gaze estéril;
5. Punciona-se a veia com uma agulha estéril e descartável, de uma seringa do sistema "Vacutainer";
6. Após a agulha colectora penetrar na veia, o sangue preenche o tubo acoplado automaticamente, devido a pressão negativa no tubo de colheita;

7. Retira-se o garrote antes de retirar a agulha do local de punção, para evitar a formação de hematomas.

## **9. 2. 2 Hemograma Completo**

### **Principio**

Consiste na contagem de leucócitos, hemácias, plaquetas, reticulócitos, contagem diferencial de leucócitos e, na determinação de hemoglobina, hematócrito e índices hematológicos (Payton e White, 1995; Fernández, 1996; Fischbach e Dunning, 2005).

### **Amostra**

Usou-se amostras de sangue venoso anticoagulado com EDTA.

### **Técnica**

O hemograma completo, é feito por aparelhos automáticos (“*Beckman Coulter*”), onde, os tubos de “*Vacutaner*” contendo amostras de sangue são colocados num acessório próprio do aparelho (Cassete).

1. Marca-se o número da cassete e o número de localização da amostra na cassete, na respectiva folha de requisição do paciente;
2. Colocam-se os tubos contendo amostras do sangue na respectiva posição da cassete até encher todas posições;
3. A cassete contendo amostras já organizadas, é colocada no aparelho;
4. Programa-se o aparelho com base no código da requisição, número da cassete e o nome do paciente;
5. Depois da programação do aparelho, os resultados são visualizados no computador e imprimidos.

### **Interpretação dos resultados**

Os resultados de hemograma, são expressos, em valores absolutos para contagem das células sanguíneas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) e determinação de hemoglobina, em valores absolutos ou percentuais para contagem diferencial de leucócitos, contagem de reticulócitos, determinação de hematócrito e índices hematológicos.

**Tabela 1.** Contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas

Tipo de célula	Nº de células /L	Designação
Leucócitos	$4.0 \times 10^9 - 11.0 \times 10^9$	Normal
	$> 11.0 \times 10^9$	Leucocitose
	$< 4.0 \times 10^9$	Leucopénia
Eritrócitos	$4.0 \times 10^{12} - 5.0 \times 10^{12}$	Normal
	$> 5.0 \times 10^{12}$	Eritrocitose
	$< 4.0 \times 10^{12}$	Anemia
Plaquetas	$150 \times 10^9 - 500 \times 10^9$	Normal
	$> 500 \times 10^9$	Trombocitose
	$< 150 \times 10^9$	Trombocitopénia

**Tabela 2.** Contagem diferencial de leucócitos

Tipo de leucócito	Nº de células/L ou (%)	Designação
Neutrófilos	$1.8 \times 10^9 - 8.0 \times 10^9$ ou 40-60	Normal
	$> 8.0 \times 10^9$ ou $> 60$	Neutofilia
	$< 1.8 \times 10^9$ ou $< 40$	Neutropénia
Eosinófilos	$0.05 \times 10^9 - 0.5 \times 10^9$ ou 0.5-5.0	Normal
	$> 0.5 \times 10^9$ ou $> 5.0$	Eosinofilia
	$0.05 \times 10^9$ ou 0.05	Eosinopénia
Basófilos	$0.02 \times 10^9 - 0.05 \times 10^9$ ou 0.4-1.0	Normal
	$> 0.05 \times 10^9$ ou $> 1.0$	Basofilia
	$< 0.02 \times 10^9$ ou $< 0.4$	Basopénia
Linfócitos	$2.3 \times 10^9 - 7.2 \times 10^9$ ou 12.8-40	Normal
	$> 7.2 \times 10^9$ ou 40	Linfocitose
	$< 2.3 \times 10^9$ ou 12.8	Linfocitopénia
Monócitos	$0.1 \times 10^9 - 0.5 \times 10^9$ ou 0.2-1.0	Normal
	$> 0.5 \times 10^9$ ou 1.0	Monocitose

	<0.1x10 <sup>9</sup> ou 0.2	Monocitopénia
--	-----------------------------	---------------

Tabela 3. Determinação de hemoglobina e hematócrito

Tipo de determinação	Valores determinação	Designação
Hemoglobina	11-18 g/dL	Normal ou normal
	>18 g/dL	Policitemia
	<11g/dL	Anemia
Hematócrito	30-59%	Normal
	>59%	Plicitemia
	<30%	Anemia

Tabela 4. Determinação de índices hematológicos

Tipo de índice	Valores determinados	Designação
Volume corpuscular médio (VCM)	82-100 $\mu\text{m}^3$	Normocitose ou normal
	>100 $\mu\text{m}^3$	Macrocitose
	<82 $\mu\text{m}^3$	Microcitose
Hemoglobina corpuscular média (HCM)	27-34 pg/célula	Normal
	>34 pg/célula	Anemia macrocítica
	<27 pg/célula	Anemia microcítica
Concentração da hemoglobina globular média (CHCM)	30-37%	Normocromia
	>37%	Hipercromia
	<30%	Hipocromia

### 9. 2. 3 Velocidade de sedimentação (VS)

#### Princípio

É uma técnica que consiste na determinação da velocidade com que sedimentam os eritrócitos. (Payton e White, 1995; Fernández, 1996; Santos e Cunha, 2000; Fischbach e Dunning, 2005). Existem vários métodos para a sua determinação, o método usado no laboratório de hematologia do LAC do HCM, é o de Westergreen.

### **Amostra**

Usou-se amostras de sangue venoso colhidas com EDTA.

### **Técnica (Figura 2)**

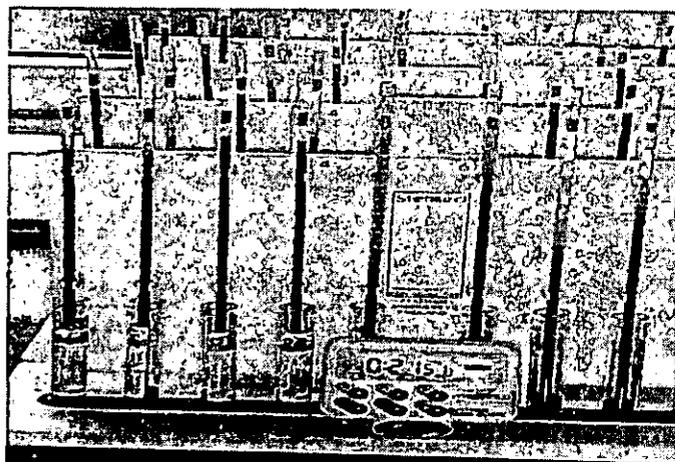
1. Pipeta-se no tubo de ensaio 0.4 ml de citrato de sódio a 3.8% (P/V);
2. Acrescenta-se 1.6 ml de sangue e mistura-se suavemente;
3. Colocam-se as pipetas de Westergreen no suporte de Westergreen numa posição rigorosamente vertical;
4. Deixa-se o suporte numa superfície totalmente plana;
5. Com ajuda de um aspirador, aspira-se a mistura com a pipeta de Westergreen até a marca "0" e confirma-se que não há bolhas de ar no seu interior;
6. Põe-se o cronómetro a funcionar durante uma hora;
7. Depois de passar uma hora, lê-se a altura da coluna de plasma.

### **Interpretação de resultados**

Os resultados são dados pela altura da coluna de plasma, no limite de separação com os eritrócitos sedimentados e, são expressos em mm/h. Os valores normais estão apresentados na tabela 5 (Kanfer e Nicol, 1997).

**Tabela 5.** Valores médios de velocidade de sedimentação, em diferentes idades e sexo a um nível de confiança de 95% (Kanfer e B. A. Nicol, 1997)

<b>Idade (anos)</b>	<b>0-20</b>	<b>20-55</b>	<b>55-90</b>	
<b>Velocidade de</b>	12	14	19	<b>Homem</b>
<b>sedimentação (mm/h)</b>	18	21	23	<b>Mulher</b>



**Figura 2.** Determinação de velocidade de sedimentação (VS).

#### **9. 2. 4 Esfregaço do sangue**

##### **Princípio**

É um exame microscópico numa camada fina de sangue distribuída uniformemente numa lâmina que permite a visualização das células. É dividido em duas técnicas. Esfregaço de gota espessa e esfregaço de gota estendida (MISAU, 1985, 2004; Fischbach e Dunning, 2005).

##### **Amostra**

Usou-se amostras de sangue venoso colhidas com EDTA.

##### **Gota estendida (Figura 3)**

##### **Técnica**

1. Escreve-se o número (código), de identificação do paciente na extremidade da lâmina;
2. Põe-se na lâmina uma gota de sangue, aproximadamente 3mm de diâmetro ao lado do número de identificação;

3. Coloca-se a lâmina sobre uma mesa;
4. Com a mão direita pega-se outra lâmina e apoia-se-a sobre a que tem a gota, um pouco por diante da gota, as duas lâminas devem formar um ângulo de 30 a 40°;
5. Recua-se a lâmina apoiada sobre a que tem sangue, até tocar na gota de sangue;
6. Deixa-se o sangue correr ao longo de todo bordo da lamina;
7. Desloca-se a lâmina para frente espalhando-se o sangue ao longo da outra lâmina, com um movimento firme e uniforme;
8. Seca-se o esfregaço no ar livre;
9. Cora-se a lâmina já secada.

### Gota espessa (Figura 3)

#### Técnica

1. Escreve-se o número (código), de identificação do paciente na extremidade da lâmina;
2. Põe-se na lâmina uma gota de sangue de aproximadamente 3mm de diâmetro ao lado do número de identificação;
3. Com ajuda de outra lâmina, espalha-se a gota de sangue;
4. Seca-se a lâmina no ar livre;
5. Cora-se a lâmina secada;

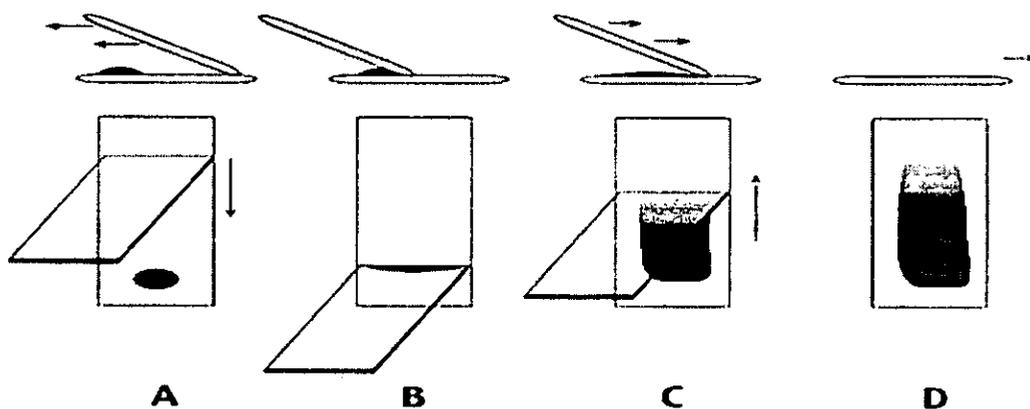
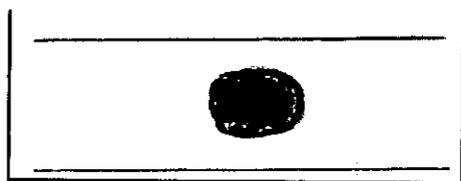


Figura 3. Esfregaço de gota estendida (Júnior, 2004).



**Figura 4.** Esfregaço de gota espessa (Júnior, 2004)

### **Coloração com reagente de Giemsa**

1. Filtra-se o corante de Giemsa;
2. Dilui-se o corante de Giemsa a 10 % com água tamponada;
3. Põe-se o esfregaço seco num suporte adequado, com o lado de estendimento na parte superior;
4. Fixa-se o esfregaço, cobrindo-se a lâmina com metanol durante 3 a 5 minutos;
5. Decanta-se o metanol;
6. Cobri-se a lâmina com reagente de Giemsa a 10%, durante 20 – 30 minutos;
7. Decanta-se o corante, e lava-se a lâmina com água tamponada;
8. Põe-se a lâmina num suporte vertical e deixa-se secar ao ar livre;
9. Faz-se a leitura da lâmina no microscópio óptico composto, a uma ampliação de 100X.

**Obs:** O esfregaço de gota espessa, não é fixado.

### **9. 2. 5 Contagem manual de reticulócitos**

#### **Amostra**

Usou-se amostra de sangue venoso colhido com EDTA.

#### **Técnica**

1. Filtra-se o corante de azul crezil brilhante;
2. Deita-se 3 gotas de azul crezil brilhante já filtrado, num tubo de ensaio;
3. Acrescenta-se 3 gotas do sangue no tubo de ensaio com o corante azul crezil brilhante;
4. Mistura-se o sangue com o corante deixa-se repousar durante 15 minutos, à temperatura do ambiente;
5. Prepara-se o esfregaço de gota estendida com essa mistura;
6. Seca-se o esfregaço no ar livre;
7. Examina-se o esfregaço ao microscópio óptico composto a uma ampliação de 100X;
8. Conta-se e calcula-se a percentagens de eritrócitos usando a seguinte fórmula:

$$\text{Reticulocitos}(\%) = \frac{\text{Total de reticulocitos}}{1000 \text{ eritrocitos}} \times 100$$

### **Interpretação de resultados**

**Tabela 6.** Contagem manual de reticulócitos

	Valores de reticulócitos (%)	Designação
Reticulócitos	2 - 3 %	Normal
	>3%	Reticulocitose
	<2%	Anemia

### **9. 2. 6 Teste de plasmódio**

#### **Princípio**

Consiste na confirmação da presença ou ausência dos parasitas que causam malária (MISAU, 1985; 2004).

#### **Amostra**

Usou-se amostras de sangue venoso colhidas com EDTA.

## **Técnica**

Usou-se a técnica de esfregaço de sangue (gota espessa e estendida), corado com reagente de Giemsa, acima descrita.

## **Interpretação dos resultados (tabela, 3 MISAU, 2004)**

**Tabela 7.** Avaliação da densidade parasitária e expressão dos resultados.

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
NSE	0 Parasitas em 100 campos
1+ ou +	1-10 Parasitas em 100 campos
2+ ou ++	10-100 Parasitas em 100 campos
3+ ou +++	1-10 Parasitas por campo
4+ ou ++++	10-100 Parasitas por campo
5+ ou +++++	100 Parasitas por campo

## 10. Resultados e discussão

Com base nas técnicas laboratoriais desenvolvidas na secção de hematologia do LAC de HCM, foi possível, durante o período de estágio, processar cerca de 10.000 amostras de sangue, trazidas das enfermárias e consultas externas (Tabela 8).

Tabela 8. Dados sobre amostras processadas na secção de hematologia do LAC do HCM durante o período de estágio.

Proviencia das amostras	Enfermagem			Consultas externas		
	VS	HC	P	VS	HC	P
Tipo de exame pedido						
Nº de amostras por exame	2280	2730	1480	3560	7140	1720
Sub total	2770			7230		
Total	10000					

VS-Velocidade de sedimentação; HC-Hemograma completo; P-Teste de plasmódio.

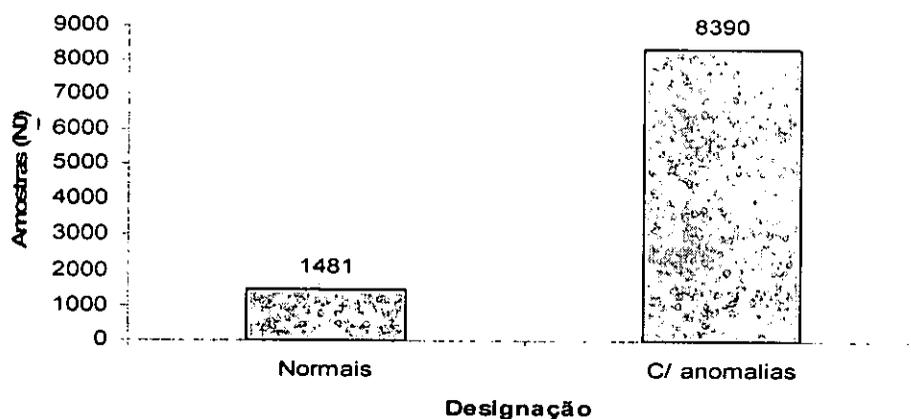


Figura 5. Resultados de amostras requisitadas para análise de hemograma

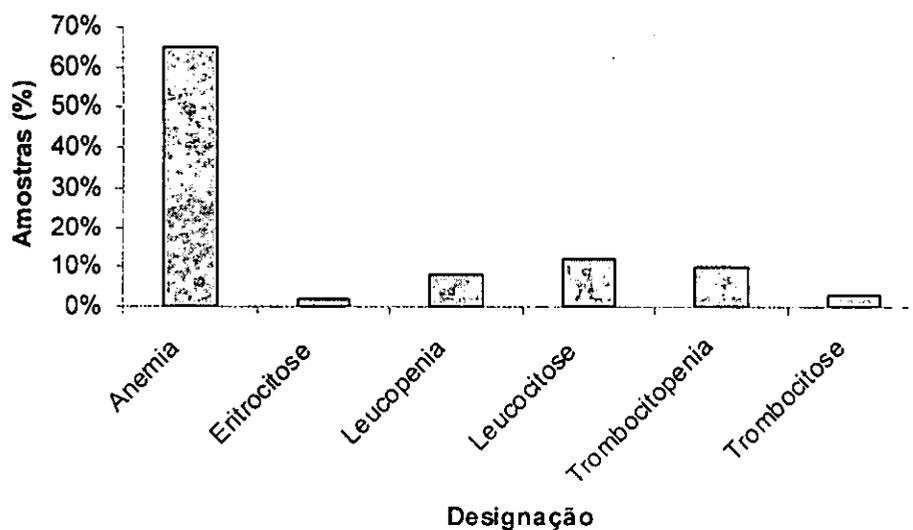


Figura 6. Frequência de anomalias, resultantes de variação do quadro hematológico, observada durante o estágio.

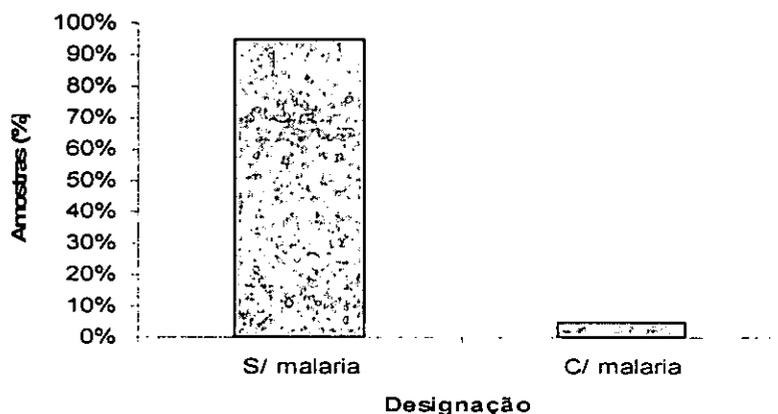


Figura 7. Resultado de pesquisa do Plasmódio

De total das amostras requisitadas para análise de hemograma (9870), durante o período do estágio, 1481 (15%) tinham quadro hematológico normal e, 8390 (85%) tinham o quadro hematológico alterado (Figura 5).

Durante o período do estágio, notu-se que, das anomalias resultantes de alteração do quadro hematológico, a anemia foi a mais prevalente (65%), seguida da leucocitose (12%) e, a eritrocitose foi a menos frequente (2%), (Figura 6). Segundo Stoltzfus *et al.* (1997), a anemia constitui um problema de saúde pública em todo o mundo,

principalmente em países em via de desenvolvimento, atingindo mais que a metade da população.

Verificou-se também que, somente 5% das amostras requisitadas para a pesquisa do Plasmódio, durante o estágio, foram positivas e 95% foram negativas (Figura 7). A baixa frequência da negatividade na pesquisa do plasmódio nas amostras processadas durante o período de estágio, provavelmente poderá ter sido a não coincidência com a época de malária, visto que, a malária é mais prevalente nos finais das chuvas ou devido a má qualidade de preparação e leitura das lâminas.

### **11. Perspectivas críticas sobre os processos de produção na unidade de estágio**

No que concerne a biossegurança, notou-se que os técnicos não cumpriam corretamente com as normas de segurança estabelecidas pela OMS, como, o uso de luvas e tocas sempre que entrar em contacto com um paciente, amostra ou qualquer outro material laboratorial altamente infeccioso.

No que diz respeito a técnicas de colheita de amostras de sangue, verificou-se que, de vez enquanto, as amostras de sangue, chegavam no laboratório de análises pouco, ou, completamente coaguladas, o que mostra o não cumprimento de todos procedimentos das técnicas.

Verificou-se também que, durante o processamento laboratorial das amostras, em algumas vezes os técnicos não cumpriam com todos os procedimentos das técnicas, o que pode conduzir a falsos resultados.

## **12. Conclusão**

O estágio é uma das variantes do trabalho de conclusão do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

A escolha da variante do estágio como trabalho de culminação do curso, foi de grande relevância, isto porque, para além de ter conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso, o estudante adquiriu também, conhecimentos e experiência práticas na execução de alguns testes laboratoriais, interpretação dos resultados, o que constituiu a parte complementar dos seus estudos. O mesmo abriu uma visão crítica no estudante, oferecendo conhecimentos profissionais, capacidade para trabalhar em equipa e individualmente, criatividade e responsabilidade no seu futuro profissional.

Durante o período do estágio, o estudante aprendeu as normas de biossegurança que devem ser mantidas no manuseamento dos materiais laboratoriais, além das próprias amostras que merecem grandes cuidados para o seu manuseamento.

Findo o estágio, concluiu-se também, que a maioria dos técnicos do sector do estágio, não cumpri com todas as normas laboratoriais.

Das amostras processadas no durante o estágio, concluiu-se que a anemia foi à anomalia mais frequente, resultante de alteração do quadro hematológico dos pacientes atendidos no HCM.

Com o estágio, o estudante adquiriu habilidades na interpretação dos resultados dos testes sanguíneos básicos realizados no sector de hematologia.

### **13. Recomendações**

No concernente ao equipamento e reagentes, recomenda-se uma manutenção periódica e aquisição de reagentes para o stok, pois verificou-se durante o período do estágio a paralisação do funcionamento de um dos aparelhos de hemograma por falta de alguns reagentes.

Recomenda-se também, a introdução de testes rápidos para a pesquisa de Plasmódio, para servir como confirmatório, pois, a somente pesquisa deste parasita no esfregaço, devido a vários factores, como qualidades do reagente, habilidades do técnico na preparação e leitura microscópica da lâmina, pode produzir falsos resultados.

Pelo fato de, os resultados de testes hematológicos serem influenciados por vários factores como, a raça, condições ambientais, económicas, demográficas e, pelo fato de variarem de um laboratório para outro, recomenda-se a determinação dos valores normais ou padrões (*"cut of"*), conforme as nossas condições.

## **14. Bibliografia**

Anónimo, (1956). *Serviços de Saúde em Moçambique*. Lourenço Marques. Editora Imprensa Nacional de Moçambique.

Fischbach, F. & M. B. Dunning (2005). *Manual de Enfermagem: Exames Laboratoriais e Diagnósticos*. 7a Edição. 736pp. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.

Fernández, J. (1996). *Manual Básico de Hematologia*. 55pp. Curso de Técnico de Laboratório. Instituto de saúde de Maputo.

Guyton, A. C & J. E. Hall (2002). *Tratado de Fisiologia Médica*. 698 pp. 10ª edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Hodgson, H. V., P. E Grundy & J. L. Robinson (2005). Early Discontinuation of Intravenous Antimicrobial Therapy in Pediatric Oncology Patients with Febrile Neutropenia. *BMC Pediatrics Journal*. 5 (10): 1261-1266.

Júnior, J. B. S. (2005). *Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malaria*. 118 pp. 1a edição. Amazônia.

Kanfer, E. J. & B. A. Nicol (1997). Haemoglobin Concentration and Erythrocyte Sedimentation rate in Primary care Patients. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 90 (1): 16-8.

Langa, J. S. (2006). *Avaliação de Frequência das Espécies de Microorganismos Patogénicos, no Material Biológico (sangue, fezes, urina, exudado vaginal e LCR), Analisado no Laboratório de Análise Clínicas do HCM. Trabalho de Culminação do Curso*. Maputo-Moçambique.

Litos, M., I. Sarris, S. Bewley, P. S. I. Okpala & E. O. Ntim (2006). White Blood Cell Count as a Predictor of the Severity of Sickle Cell Disease During Pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 133: 169-172.

MISAU (1985). *Manual de Microscopia de Malária*. 51pp. Maputo. Instituto Nacional de Saúde.

MISAU (2004). *Manual para Reciclagem no Diagnóstico Laboratorial da Malária*. 43pp. Maputo. Programa Nacional de Combate da Malária.

Murray, R. P., Ruesenthal, G. Kbayashi & M. A. P. Faller (2002). *Microbiologia Médica*. 519 pp. 4a edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Payton, R. G. & P. J. White (1995). Assessment of Hematologic Disorders. *Journal of Nurse-Midwifery*. 40 (2): 120-136.

Santos, V. M., S. F. Cunha & D. F. Cunha (2000). Velocidade de Sedimentação das Hemácias: Utilidade e Limitações. *Rev Ass Méd Brasil*. 46 (3): 232-236.

Selig C. & W. Nothdurft (1995). Cytokines and Progenitor Cells of Granulocytopoiesis in Peripheral Blood of Patients with Bacterial Infections. *American Society for Microbiology*. 3 (1): 104-109.

Seppa, K., P. Sillanaukeet & M. Arni (1993). Blood Count and Hematologic Morphology in Nonanemic Macrocytosis: Differences between Alcohol Abuse and Pernicious Anemia. *Journal of Alchol*. 10: 343-347.

Stoltzfus, R. J., H. M. Chwaya, J. M. Tielsch, K. J. Schulze, M. Albonico & L. Savioli (1996). Epidemiology of iron Deficiency Anemia in Zanzibari Schoolchildren: The importance of Hookworms. *American Society for Clinical Nutrition*. 65: 153-159.

Wills, T. S., J. P. Nadler, C. Somboonwit, A. Vicent, G. Leitz, K. Marino, E. Naik, S. Powers, N. Khan & B. Laart (2004). Anemia Prevalency and Associated Risk Factors in Single-Center Ambulatory HIV Clinical Cohort.