

Mariana do Rosário Ramos

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Frederico
Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

(Para efeitos de paginação)

Folha de Ros

Mariana do Rosário Ramos

Relatório de Estágio - Mestrado em Análises Clínicas

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Relatório de Estágio do Mestrado em Análises Clínicas, decorrido no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E.P.E. -sob orientação da Dr. Frederico Valido, com um total de 600 horas, compreendidas entre Novembro e Maio de 2012 nas áreas de Imunologia e Hematologia.

Setembro

Índice

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas.....	xi
Resumo	xiii
Introdução	1
Caracterização do Laboratório de Estágio	2
Controlo de Qualidade	3
A Fase Pré-Analítica	3
A Fase Analítica.....	4
A Fase Pós Analítica.....	4
Controlo de Qualidade Interno e Externo	4
Escolha dos anticoagulantes	5
Microbiologia	7
Análise de urinas.....	7
Bioquímica	9
Imunologia/Hormonologia	10
Princípios dos imunoensaios	11
Imunoensaio competitivo	11
Imunoensaio sandwich/ não competitivo.....	12
Técnicas manuais	13
Sistemas automáticos de Imunologia	14
Electroquimioluminescência.....	14
Quimioluminescência	16
TRACE.....	18
Imunoturbidimetria	19
Marcadores Tumorais.....	20
Antigénio Carbohidrato 125	20
Antigénio Carbohidrato 15.3.....	21
Antigénio Carbohidrato 19.9.....	21
Antigénio Carbohidrato 72.4	21
CYFRA 21.1	21

Enolase Neuro Específica.....	22
Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas.....	22
Antigénio Carcinoembrionário.....	22
Alfa-fetoproteína	22
Subunidade Beta da Gonadotrofina Coriónica Humana	22
β 2-microglobulina	23
Cromogranina A.....	23
Antigénio Específico da Próstata	23
Calcitonina.....	24
Electroforese no sistema Hydrasis.....	25
Electroforese de proteínas séricas	25
Intepertação do proteinograma	26
Albumina.....	26
α -1 Globulinas	26
α -2 Globulinas.....	26
β – Globulinas.....	27
Gama – Globulinas	27
Gamapatias policlonais.....	28
Gamapatias monoclonais	28
Imunofixação	29
Alguns exemplos práticos de Gamapatias	30
Hematologia.....	33
Procedimentos de rotina no Sector de Hematologia.....	34
Hemograma e Esfregaço Sanguíneo.....	34
Eritrograma	35
Eritrócitos	35
Quantificação da Hemoglobina	37
Hematócrito	37
Hemoglobina Corpuscular Média.....	37
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média.....	38
Volume Corpuscular Médio	38
Variação do tamanho dos eritrócitos	38
Reticulócitos	38

Plaquetas	39
Leucograma	40
Neutrófilos	40
Basófilos.....	41
Eosinófilos	41
Monócitos.....	41
Linfócitos	42
Velocidade de Sedimentação	42
Hemostase.....	44
Coagulação Sanguínea	44
Estudos Coagulativos.....	46
Tempo de protrombina.....	46
Tempo de Tromboplastina Parcial activada.....	47
Tempo de Trombina.....	48
Fibrinogénio	48
D-dímeros	48
Patologias mais comuns associadas à coagulação.....	49
Hemofilia A.....	49
Hemofilia B.....	49
Doença de Von Willebrand	49
Deficiência de vitamina K.....	49
Conclusões.....	50
Bibliografia	51

Índice de Figuras

Figura 1 Ilustração de ensaio competitivo.....	11
Figura 2 Relação entre a concentração do antígeno do doente e a intensidade do sinal, no ensaio competitivo	12
Figura 3 Ilustração de ensaio não competitivo	12
Figura 4 Relação entre a concentração do antígeno do doente e a intensidade do sinal no ensaio não competitivo	13
Figura 5 Esquema ilustrativo do método electroquimioluminescente <i>sandwich</i>	15
Figura 6 Cobas e 411, da Roche (www.roche.pt)	16
Figura 7 Sistema Automático Immulite 2000, da Siemens.....	18
Figura 8 Equipamento Kryptor	19
Figura 9 Equipamento Konelab 60i.....	20
Figura 10 Proteinograma em gel de agarose, utilizando o Hydrasys ⁽¹⁹⁾	25
Figura 11 Gráfico de corrida electroforética normal (18).....	25
Figura 12 Principais proteínas encontradas em cada fracção electroforética (com destaque para as Ig's) ⁽¹⁸⁾	27
Figura 13 Imunofixação sérica de pacientes com gamopatias monoclonais IgG kappa e IgA lambda ⁽²²⁾	29
Figura 14 Electroforese de Proteínas do Caso 1	30
Figura 15 Imunofixação de proteínas séricas realizado no Caso 1	30
Figura 16 Electroforese de Proteínas do Caso 2.....	31
Figura 17 Imunofixação de proteínas séricas realizado no Caso 2.....	31
Figura 18 Electroforese de Proteínas do Caso 3.....	32
Figura 19 Imunofixação de proteínas séricas realizado no Caso 3.....	32
Figura 20 Pesquisa de Bence Jones no Caso 3.....	32
Figura 21 Esquema de Focagem Hidrodinâmica utilizado na tecnologia VC.....	35
Figura 22 Alifax Test I BCL.....	42

Figura 23 Exemplo de Hemograma e VS executado no sector de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do IPO	43
Figura 24 ACL TOP 500, Instrumentarion Laboratory.....	44
Figura 25 Esquema representativo do modelo da cascata da coagulação.....	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 Número de doentes atendidos no serviço nos últimos 3 anos	2
Tabela 2 Número de parâmetros quantificados em cada sector, nos últimos 3 anos...	2
Tabela 3 Tabela indicativa de parâmetros feitos por técnicas manuais no sector de Imunologia/Hormonologia	14
Tabela 4 Analitos doseados no Sistema Cobas e 411	16
Tabela 5 Analitos doseados no Sistema Automático Immulite 2000.....	18

Abreviaturas

- AFP** – Alfa-fetoproteína
- aPTT** – Tempo de Tromboplastina Parcial activada
- BMG** – β 2- Microglobulina
- CA 125** – Antígeno Carbohidrato 125
- CA 15.3** – Antígeno Carbohidrato 15.3
- CA 19.9** – Antígeno Carbohidrato 19.9
- CA 72.4** – Antígeno Carbohidrato 72.4
- CAL** – Calcitonina
- CEA** – Antígeno Carcinoembrionário
- CGA** – Cromogranina A
- CHCM** – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- ECLIA** – Electroquimioluminescência
- EDTA-K3** – Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
- EGTM** – *European Group on Tumor Markers*
- FT** – Factor Tecidual
- FVW** – Factor de Von Willebrand
- GMSI** – Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
- Hg** – Hemoglobina
- HBP** – Hiperplasia Benigna da Próstata
- HCM** – Hemoglobina Corpuscular Média
- HCT** – Hematócrito
- Ig** – Imunoglobulina
- IGF-I** – Factor de Crescimento Insuline-like
- INR** – *International Normalized Ratio*
- IPOCFG** – Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil
- IRMA** – *Immunoradiometric assay* – Ensaio imunoradiométrico
- ISI** – Index de Sensibilidade Internacional
- LDH** – Lactato Desidrogenase
- LCR** – Líquido Cefalorraquídeo
- NSCLC** – *Non Small Cells Lung Cancer*
- NSE** – Enolase Neuro Específica
- PCR** – Proteína C Reactiva
- PSA** – Antígeno Específico da Próstata

PT – Tempo de Protrombina

RDW – Variação do tamanho dos eritrócitos

RIA – *Radio Immunoassay* – Radio Imunoensaio

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*

RNA – Acido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SCC – Antígeno do carcinoma de células escamosas

TAC – Técnico de Análises Clínicas

TG – Tireoglobulina

TRACE – *Time-Resolved Amplified Cryptate Emission*

TSAC – Técnico Superior de Análises Clínicas

TT – Tempo de Trombina

VCM – Volume Corpuscular Médio

VCS – Velocidade, Condutividade e Dispersão

VS – Velocidade de Sedimentação

β-HCG – Subunidade Beta da Gonadotrofina Coriónica Humana

Resumo

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E.P.E (IPOCFG E.P.E), no âmbito das análises clínicas.

O estágio teve como principal objectivo a minha integração no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E, proporcionando-me a aquisição de habilidades práticas na execução das técnicas laboratoriais, sempre associadas a um conhecimento teórico que me permita fazer a interpretação dos resultados.

As áreas aprofundadas neste relatório são a Imunologia e a Hematologia, sendo feita apenas uma referência genérica à Bioquímica e à Microbiologia.

Abstract

The following report refers to the internship done at Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E.P.E (IPOCFG E.P.E), in the context of clinical analysis.

The main goal of my internship was an integration in the clinical pathology service of IPO, which provided me the opportunity to acquire practical skills in the performance of laboratory techniques, always associated with a theoretical knowledge which allowed me to interpret the results.

In this report, the emphasized areas are Immunology and Hematology, and there's only a generic reference about Biochemistry and Microbiology.

Introdução

O estágio curricular realizado teve como principal objectivo a minha integração na rotina do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E, sob a orientação do Doutor Frederico Valido. Esta integração na prática laboratorial foi fundamental para percepção de todas as responsabilidades que tem um Técnico Superior de Análises Clínicas (TSAC). Deste modo, foi útil para a aplicação prática dos conhecimentos científicos adquiridos ao longo do curso.

A área das Análises Clínicas está em constante expansão e desenvolvimento e constitui umas das áreas fundamentais dentro das ciências da saúde. As técnicas utilizadas têm cada vez mais tendência para a eficácia, garantindo assim a qualidade dos resultados.

Este estágio foi realizado durante 7 meses e fez um tempo de 600 horas. O tempo foi repartido pelas valências de Química Clínica, Microbiologia, Hematologia e Imunologia/Hormonologia, permanecendo um mês em cada sector. Selecionei Hematologia e Imunologia para maior aprofundamento, sendo que estive mais um mês nestes sectores.

São referidos os procedimentos de Controlo de Qualidade que se têm em conta, de modo a minimizar os erros a que o processo analítico está sujeito. No final desta parte é realizada uma apreciação global de como os conhecimentos adquiridos durante a fase curricular do Mestrado de Análises Clínicas auxiliaram na aprendizagem prática.

Caracterização do Laboratório de Estágio

O Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E, situado no edifício da Oncologia Médica e Laboratórios (Piso 0), é constituído por quatro sectores distintos, sendo o director do serviço o Doutor Frederico Valido. O sector da Bioquímica está sob a orientação do Doutor Luís Nina, o sector da Microbiologia pela Doutora Elvira Malta, o sector de Hematologia pela Doutora Joana Diamantino e o sector de Imunologia/Hormonologia pelo Doutor Nuno Cunha. O serviço conta também com a colaboração do pessoal administrativo, Técnicos de Análises Clínicas (TAC), TSAC's e clínicos. O serviço conta com uma sala de espera, duas salas de colheitas, a recepção, a sala de lavagem do material, o gabinete do chefe do serviço e os espaços pertencentes aos diferentes sectores.

Diariamente o serviço recebe aproximadamente 300 amostras para serem analisadas, dentre as quais a grande maioria dos pedidos são dirigidos à bioquímica, hematologia e imunologia.

A seguinte tabela (Tab. 1) mostra o número de doentes atendidos no serviço nos últimos 3 anos.

Tabela 1 - Número de doentes atendidos no serviço nos últimos 3 anos

	2009	2010	2011
Nº doentes	64.503	65.440	67.351

Na tabela abaixo (Tab. 2) é visível o número de parâmetros quantificados em cada sector, nos últimos 3 anos.

Tabela 2 - Número de parâmetros quantificados em cada sector, nos últimos 3 anos

Sectores	2009	2010	2011
Bioquímica	759.099	792.496	790.891
Hematologia	132.269	133.062	123.675
Imunologia	65.655	71.300	69.771
Microbiologia	9.871	11.971	10.893
Hormonologia	36.935	38.980	37.501
Total	1.003.829	1.047.809	1.032.731

Apesar de haver um crescente número de doentes atendidos no serviço verifica-se um decréscimo do número de pedidos no último ano. Isto provavelmente está relacionado com os condicionantes de ordem económica a que os próprios clínicos estão sujeitos.

Controlo de Qualidade

A principal preocupação do laboratório deve estar relacionada com a qualidade dos resultados dados ao clínico.

Esta qualidade depende dos procedimentos que se fazem desde a colheita até à obtenção do resultado ao longo de três fases: a Fase Pré-Analítica, Analítica e Pós-Analítica⁽¹⁾.

Durante muito tempo os laboratórios focaram-se no controlo dos erros da fase analítica⁽²⁾, no entanto actualmente é sabido que a maioria dos erros provém da fase pré-analítica, erros devidos por exemplo à colheita, manuseamento e transporte da amostra⁽¹⁾.

A Fase Pré-Analítica

Um erro da fase pré-analítica influencia decisivamente o erro total, e consequentemente o resultado analítico que o laboratório dá ao clínico. Assim, um adequado tratamento na fase pré-analítica pode evitar a repetição de provas, colheitas e um diagnóstico incorrecto que conduza a um tratamento inadequado⁽³⁾.

Os erros da fase pré-analítica são os mais comuns atingindo cerca de 46%-68% dos erros totais de um laboratório⁽⁴⁾. O preenchimento inadequado do pedido, uma inadequada preparação do paciente, uso excessivo do garrote, extracção lenta ou difícil ou por via heparinizada, má identificação da amostra ou um anticoagulante errado, enchimento do tubo com volume de sangue inadequado, tempo prolongado do transporte, conservação da amostra a temperaturas inadequadas ou centrifugação incorrecta são alguns exemplos de erros que podem ser cometidos nesta fase⁽¹⁾.

A fim de reduzir os erros totais, a fase pré analítica deve ter prioridade. Devem ser desenvolvidos procedimentos próprios, o pessoal deve ser treinado especificamente e deve haver uma cooperação inter-sectorial. A associação de robótica de maneira a inovar o laboratório com tecnologia recente é também uma boa ferramenta para reduzir os erros nas colheitas e manipulação das amostras⁽⁴⁾.

A Fase Analítica

A fase analítica corresponde à fase da realização da análise propriamente dita, sendo que a manutenção dos equipamentos, a calibração, o controlo de qualidade e a preparação das amostras estão compreendidas nesta fase.

Um aspecto relevante a ter em conta nesta fase é a hidratação dos reagentes, controlos e calibradores. Um mau procedimento implica erros fatais no processo analítico das amostras, na calibração e nos controlos. É então importante proceder de maneira correcta e ter todos os cuidados necessários à sua preparação. Um mau funcionamento do equipamento e falhas não detectadas no controlo de qualidade são também uma importante fonte de erros nesta fase ⁽⁴⁾.

Com o aparecimento da automatização, os erros da fase analítica têm vindo a diminuir de forma radical. Esta automatização é então vantajosa também deste ponto de vista, uma vez que a diminuição de erros leva conseqüentemente a uma redução dos custos já que as repetições são bastante menos acentuadas. Temos como exemplo de outras vantagens da automatização o tempo reduzido na análise dos parâmetros, o aumento da precisão e exactidão dos resultados. O laboratório procura sempre dar o resultado ao clínico com o máximo de confiança possível ⁽³⁾.

A Fase Pós Analítica

Esta fase consiste na avaliação final de todos os resultados, que culmina com a validação biopatológica, emissão e entrega do boletim analítico. Os erros que resultam desta fase podem ter origem quando acontece uma falha na comunicação, uma validação errada dos dados analíticos ou uma entrada de dados errada proveniente do sistema ⁽⁵⁾.

Controlo de Qualidade Interno e Externo

O controlo de qualidade é um conjunto de procedimentos postos em prática no laboratório com vista a obter fiabilidade nos resultados das análises à medida que elas vão sendo executadas ⁽⁶⁾.

Neste laboratório existem procedimentos de controlo da qualidade para monitorizar a validação dos ensaios. Os dados resultantes destes procedimentos são registados de maneira a que se possam detectar tendências.

Em todos os sectores é feito o controlo de qualidade interno e externo. O controlo de qualidade interno permite reduzir a imprecisão e é feito diariamente em todos os equipamentos utilizando 2 ou 3 níveis de controlo diferentes (Controlo normal, patológico nível 1 e patológico nível 2). Utiliza-se também sempre que um novo kit ou lote é utilizado bem como quando se verifica alguma tendência dos resultados. Implica a análise de materiais de controlo o mais similares possível às amostras dos pacientes, assegurando assim a qualidade dos resultados obtidos, pois é efectuado em paralelo com as amostras e em condições semelhantes, permitindo a validação analítica dos resultados dos pacientes. O resultado dos controlos expressa-se numericamente e graficamente.

Os valores alvo teóricos de cada nível de controlo encontram-se nas bulas do respectivo controlo. O laboratório define os critérios de aceitação e de um modo geral usa-se a média ± 2 desvios padrão. De acordo com cálculos estatísticos, este intervalo representa o intervalo de confiança para o qual existe 95,5% de probabilidade do valor do controlo estar dentro do intervalo.

No controlo de qualidade externo o laboratório analisa amostras com valores desconhecidos provenientes de uma entidade externa acreditada (no caso específico deste laboratório o RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme) e o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge). Este programa permite ao laboratório medir a sua capacidade de obter um resultado exacto e comparar os seus resultados com outros laboratórios equipados com a mesma tecnologia e reagentes, valorizando assim a exactidão do laboratório.

Escolha dos anticoagulantes

Os anticoagulantes são usados para fazer análise em sangue total ou plasma. Em geral, os anticoagulantes têm como principal papel a interrupção da activação da cascata de coagulação, inibindo a formação da protrombina, impossibilitando a formação do coágulo. A análise pode ser realizada em sangue total (ex.: Hemograma), plasma (ex.: Provas de coagulação) e soro (ex.: Parâmetros Bioquímicos e Serológicos). Quando a análise é

realizada em soro, a colheita é feita em tubo sem anticoagulante, para que ocorra o processo de coagulação. Quando se pretende fazer a análise em plasma ou em sangue total, a amostra deve ser colhida para tubo com anticoagulante específico.

As amostras para hemogramas são colhidas em tubos com EDTA-K3 (ácido etilenodiaminotetracético tripotássico) que permite uma estabilidade morfológica dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas até 24 horas. Este liga-se ao cálcio, impedindo a coagulação. A sua concentração na amostra de sangue é importante, uma vez que se for baixa há a formação de micro-coágulos, e se for alta provoca variações morfológicas nas células sanguíneas. Assim a sua concentração ideal é de 1-2 mg/ml de sangue.

Para estudos de coagulação é utilizado o Citrato de sódio por preservar os factores V e VIII. Também previne a coagulação por formar um complexo solúvel com o cálcio, bloqueando a cascata de coagulação. É o anticoagulante mais indicado para os testes de monitorização terapêutico da heparina e o mais adequado para estudos de agregação plaquetária. A concentração também é importante, sendo a ideal de 1 parte de citrato de sódio para 9 partes de sangue, pois se se colher menos sangue a proporção de citrato aumenta. Este aumento pode não ter efeito sobre provas de coagulação em pacientes normais, mas prolonga os tempos de coagulação em pacientes anticoagulados. Quando se utilizam vários tubos de colheita de sangue venoso, o tubo destinado à coagulação deve ser o segundo ou o terceiro para minimizar o efeito do Factor tecidual (FT) libertado com a punção venosa. É essencial verificar a mistura correcta do sangue com o anticoagulante e inclinar suavemente o tubo, evitando a formação de espuma. A agitação excessiva pode provocar hemólise. O tubo de sangue citratado pode ser conservado a temperatura ambiente durante um máximo de 2 horas após a extracção. As amostras que não cumpram a proporção de sangue/anticoagulante devem ser rejeitadas bem como as amostras hemolisadas, já que a hemólise activa a coagulação. O mesmo se deve fazer com amostras em que o sangue esteja coagulado. Os resultados destas amostras não são, de todo, fiáveis⁽⁷⁾.

Microbiologia

A este sector chegam vários tipos de amostras biológicas, como sejam urina, pus, hemocultura, expectoração, líquido cefalorraquídeo (LCR), fezes, entre outros, para fazer as análises devidas.

Este sector encontra-se subdividido em duas partes. Numa das partes da sala do sector faz-se a análise da urina no *cobas u 411* da Roche, enquanto que na outra parte é feita a pesquisa de microrganismos e a sua identificação através do antibiograma, feito no VITEK® 2 Compact 15, da Biomerieux. O *BACTEC™ 9050* da Becton Dickinson é utilizado para as hemoculturas. Conta também com uma câmara de fluxo laminar da Forma Scientific e uma incubadora da mesma marca. Numa outra sala encontram-se os microscópios onde são feitas as observações microscópicas.

Os TAC'S têm como responsabilidade a recepção das amostras, fazer as listas de trabalho, verificar os produtos em falta, executar as sementeiras e tratar das urinas, efectuando os procedimentos necessários à análise da urina tipo II. Já a TSAC que é também a chefe do sector, coordena todo o sector, avalia as caixas semeadas nos dias anteriores e os resultados das identificações e antibiogramas e faz a respectiva validação biopatológica. Tem também a responsabilidade de observar microscopicamente os exames a fresco e os exames corados.

Neste sector foi-me explicada a rotina laboratorial, sendo a minha principal função acompanhar a TSAC na observação das placas, observações microscópicas e validação biopatológica dos resultados.

Análise de urinas

A urina tipo II, também chamada de sumária é uma análise feita à urina onde são analisadas as características físicas e químicas desta e o exame microscópico do sedimento urinário. Estas amostras de urina devem ser analisadas o mais rápido possível nunca passando mais de duas horas entre o tempo de colheita e o tempo da análise para não falsear alguns resultados. No Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E. este tempo é bastante reduzido uma vez que as amostras provenientes da sala de colheitas vão quase imediatamente para o sector de Microbiologia, e as amostras que vêm das enfermarias, em malas térmicas, também não tardam a chegar ao sector. De entre as possíveis maneiras de fazer a colheita de urina, a mais usual é a colheita do jacto intermédio. É importante dar a conhecer ao doente a forma mais adequada de fazer esta colheita, explicando e dando

folhetos com ilustrações. Deve-se desperdiçar a primeira micção, e fazer a recolha do jacto intermédio para um recipiente estéril, depois de uma boa higiene. A primeira urina da manhã é a amostra ideal pois há maior concentração de compostos, e não há outras interferências provocadas por outros factores. Uma boa higiene também é factor preponderante, principalmente no que respeita à urocultura, para evitar o aparecimento de contaminação com flora normal da entrada da uretra.

A urina é uma das principais vias de excreção do organismo e a sua análise pode oferecer informações importantes sobre o estado fisiológico do organismo, sobre a presença e a evolução de muitas doenças sistêmicas, sobre a avaliação de certos tratamentos e sobre o estado funcional dos rins.

As fitas usadas para fazer a sumária de urina são lidas no Cobas u 411. Esta leitura revela-nos informação acerca da densidade, pH, cor e aspecto da urina. Dá também uma apreciação qualitativa de leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, cetonas, urobilinogénio, bilirrubina, eritrócitos, classificando como negativo, normal, ou positiva a presença destes compostos. A densidade deve estar compreendida entre 1,005 e 1,035, o pH entre 4,8 e 8, pode apresentar vestígios de urobilinogénio e bilirrubina, e deve ter um aspecto límpido, odor característico e cor amarela. Alterações nestes parâmetros podem indicar lesões pré-renais, renais ou pós-renais. De seguida a urina é centrifugada e a visualização microscópica do sedimento urinário é realizada por um TAC, onde é realizada a pesquisa de eritrócitos, leucócitos, bactérias, leveduras, células epiteliais, cilindros hialinos e cristais. A presença destes compostos em grande número pode estar associada a diferentes patologias.

Quando um sedimento de urina apresenta alterações é feito um esfregaço com esse sedimento e uma coloração de Gram, para se observar ao microscópio óptico ⁽⁸⁾.

Bioquímica

Este sector encontra-se dividido em três partes. Na primeira, as amostras são recebidas e centrifugadas 10 minutos a 3000 rpm para se obter o soro (o sector conta com duas centrífugas uma Centra CL3 e uma Centra CL4, ambas da IEC). Ainda nesta zona do sector existe o que se chama “altar de soros” onde as amostras estão organizadas já com etiquetas de códigos de barras com o número correspondente ao número do dia. Esta parte da sala conta também um espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02.

Numa outra parte da sala, encontra-se a secretária do chefe do sector onde se dá a validação biopatológica. Nessa sala existe também um gasómetro Ciba Corning 855® da Siemens, RapidChem 744 da Siemens para confirmação de resultados dos iões Na^+ , K^+ e Cl^- e um Reflotron da Roche que utiliza a química seca para determinação de vários parâmetros, de uma forma rápida.

Para determinação da grande maioria dos parâmetros bioquímicos existem dois Cobas c501 que estão ligados em cadeia e um Cobas c311, da Roche. Nesta parte do sector existem ainda dois gasómetros ABL 555 da Radiometer.

No sector da Bioquímica estudam-se os parâmetros bioquímicos que esclarecem o estado funcional de vários órgãos e vias metabólicas.

Foi-me dada a oportunidade de realizar algumas determinações através de técnicas manuais. Apesar de já não estarem em uso, permitiu-me adquirir os fundamentos teóricos necessários à compreensão do funcionamento dos equipamentos. Fiz o doseamento de vários iões como o cloro, cobre, cálcio total, cálcio ionizado, ferro, fósforo e magnésio; A determinação da capacidade total de fixação do ferro; O doseamento de lípidos como o colesterol, triglicéridos e fosfolípidos; E ainda outras determinações como proteínas totais, ácido úrico e hemoglobina glicada.

Imunologia/Hormonologia

Este sector encontra-se dividido fisicamente em três salas. A sala principal conta com vários equipamentos para a determinação de diversos parâmetros. O Immulite 2000 Xpi e o Immulite 2000 (ambos da Siemens) funcionam agregados a um braço robótico (Versa Cell) que distribui as amostras pelos dois aparelhos, de modo a rentabilizar o tempo para a análise. Existem também o Kryptor da Brahms e o cobas e 411 da Roche. No Konelab fazem-se a Proteína C Reactiva (PCR) e o doseamento de imunoglobolinas. No Liaison da DiaSorin fazem-se os marcadores cardíacos e o Viva E da Siemens é utilizado para doseamento de drogas. Na sala B do sector encontra-se para análise das proteínas séricas o Hydrasys da Sebia, para a auto-imunidade o Unicap e o contador gama 1272 CliniGamma CKB Wallac – Automatic Gamma Counter, que faz as leituras das amostras tratadas, através de técnicas manuais, com iodo marcado radioactivamente. Para leitura dos resultados do iodo urinário é usado um leitor de absorvancias ABE-2 Plus. Nesta sala existe ainda uma centrífuga refrigerada de modelo Juan BR4i- Multifunction Thermo Electron Corporation, e uma ultra-centrifuga TL100, da Beckman. Existe ainda uma sala onde se encontram os frigoríficos, uma sala comum onde estão os vestiários e um gabinete do chefe do sector.

Neste sector são efetuados os doseamentos de marcadores tumorais, hormonas e algumas proteínas. Estuda-se também o perfil electroforético e imunológico das proteínas do soro e é realizada a pesquisa de autoanticorpos na secção de auto-imunidade.

As amostras que chegam ao sector com o número do dia proveniente da sala de colheitas, são registadas num programa interno (Omega 3000, da Roche) onde recebem um número associado a um código de barras. As amostras chegam ao sector em tubos apropriados que permitem a coagulação do sangue e são centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. Neste sector existem protocolos internos (ex: MAM, TI4, etc...) onde já estão inseridos diversos conjuntos de parâmetros a dosear, de modo a facilitar o seu registo. Assim quando se colocam os tubos nos autoanalísadores, e por estes estarem ligados em rede, os aparelhos iniciam os testes pedidos anteriormente enviando depois o resultado para o computador central, ao qual o chefe do sector tem acesso para proceder à validação biopatológica. As amostras seguem um circuito que respeita a seguinte ordem: Immulite 2000, Kryptor, Cobas e 411, Konelab e Liaison.

Há que ter em atenção o estado das amostras. No caso de aparecerem amostras lipémicas os soros têm de ser ultracentrifugados e as amostras hemolisadas podem indicar

um tratamento incorrecto da amostra antes do envio para o laboratório, portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

Os parâmetros relacionados com a endocrinologia elucidam acerca da acção, síntese e regulação de várias hormonas no organismo. Os parâmetros toxicológicos fazem a pesquisa de drogas no organismo. Estes parâmetros não são abordados neste relatório, dando-se apenas ênfase aos marcadores tumorais.

Existem determinados parâmetros cujos resultados são obtidos a partir de técnicas manuais. Enquanto os resultados do iodo urinário são obtidos através da leitura de absorvâncias, todas as outras técnicas manuais feitas neste sector têm como base a leitura num contador gama.

Todos os imunoensaios realizados envolvem o uso de anticorpos específicos dirigidos contra os marcadores tumorais plasmáticos. No entanto, estas técnicas de determinação dos parâmetros analíticos podem diferir no princípio do imunoensaio (ensaio competitivo ou não-competitivo/*sandwich*) e no método de detecção do complexo antígeno-anticorpo (métodos radioactivos, fluorescentes, quimioluminescentes, electroquimioluminescentes, *Time-Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE) e imunoturbidimetria).

Princípios dos imunoensaios

Imunoensaio competitivo

Neste tipo de ensaio, o antígeno presente na amostra do doente e um antígeno idêntico, mas marcado com um radioisótopo, um fluorocromo ou outro agente de detecção, competem pela ligação a um anticorpo específico.

O antígeno marcado é misturado com o anticorpo a uma concentração em que há saturação dos locais de ligação antígeno – anticorpo.

De seguida a amostra é adicionada, e como o anticorpo não distingue antígenos marcados de não marcados, os dois tipos de antígenos vão competir pela ligação ao anticorpo (se existir antígeno na amostra do doente) (Fig. 1).

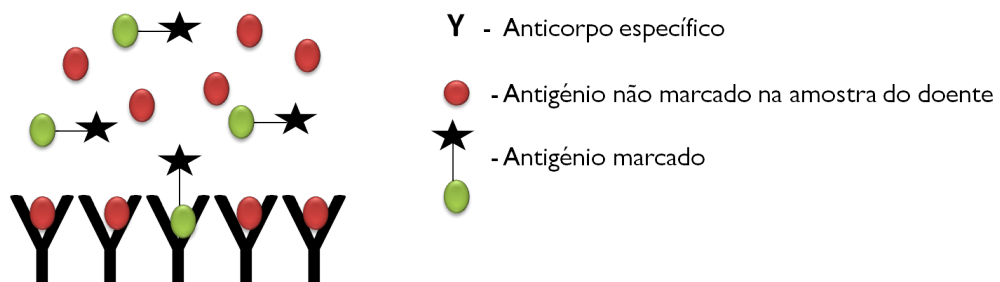


Figura 1 - Ilustração de ensaio competitivo

Assim, quanto maior for a concentração de antígeno não marcado na amostra, menor será a quantidade de antígeno marcado que se liga ao anticorpo. Há uma correlação inversa entre a quantidade de antígeno marcado ligado ao anticorpo e a concentração de antígeno presente na amostra. Ou seja, o sinal originado pelo antígeno marcado é inversamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra biológica, seja plasma, soro ou urina (Fig. 2). O ensaio competitivo utiliza-se sobretudo, para pequenos analitos de baixo peso molecular ⁽⁹⁾.

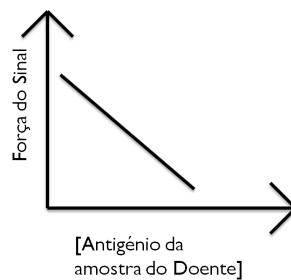


Figura 2 Relação entre a concentração do antígeno do doente e a intensidade do sinal, no ensaio competitivo

Imunoensaio *sandwich*/ não competitivo

O anticorpo é usualmente marcado em vez do antígeno. O ensaio decorre em duas etapas. Na primeira, o antígeno presente na amostra reage com um anticorpo específico (anticorpo primário) imobilizado numa matriz insolúvel de fase sólida, como por exemplo micropartículas, esferas de latex ou as paredes dos tubos de polipropileno. Em seguida, é adicionado um outro anticorpo (anticorpo secundário) que reconhece uma região do antígeno distinta daquela que se liga ao anticorpo primário (Fig. 3).

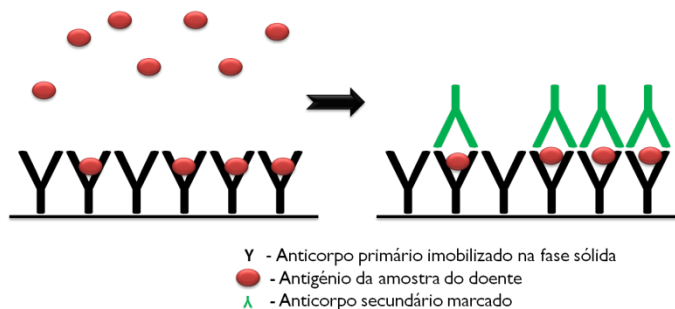


Figura 3 Ilustração de ensaio não competitivo

A intensidade do sinal emitido pelo complexo anticorpo primário – antígeno – anticorpo secundário é directamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra do doente (Fig. 4).

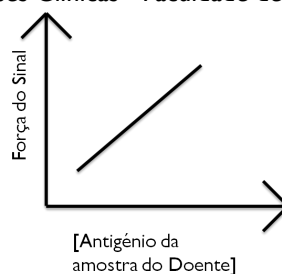


Figura 4 Relação entre a concentração do antígeno do doente e a intensidade do sinal no ensaio não competitivo

Este método é particularmente útil para antígenos que não podem ser facilmente marcados. Utiliza-se vulgarmente para antígenos com elevado peso molecular, desde que possuam duas ou mais regiões moleculares que possam funcionar como determinantes antigénicos (antígenos divalentes ou polivalentes).

Técnicas manuais

Radio Imunoensaio e Ensaio Imunoradiométrico

Nas técnicas manuais o antígeno é marcado radioactivamente com um isótopo I^{125} , detectado e quantificado depois num contador gama – *Automatic Gamma Counter*. A intensidade do sinal medido é inversamente proporcional à concentração de antígeno na amostra testada no método RIA. Na técnica IRMA é o anticorpo secundário que é marcado radioactivamente e detectado pelo mesmo método. A intensidade da radiação é então directamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra do doente ⁽⁹⁾.

As concentrações nas amostras dos pacientes são calculadas a partir de curvas de calibração, elaboradas com padrões de concentrações conhecidas.

Estas técnicas manuais têm caído em desuso nos últimos anos. Para além de se querer evitar o contacto com produtos radioactivos, esta metodologia requer mais trabalho por parte dos técnicos, o que pode induzir mais facilmente em erros da fase analítica. No sector de imunologia do IPOCFG actualmente ainda se usa para uma quantidade significativa de parâmetros (Tab. 3) mas o número de amostras não é muito elevado, pelo que normalmente se congelam os soros durante alguns dias até que haja um número suficiente para realizar os ensaios, não desperdiçando assim reagentes para as curvas de calibração. O facto dos marcadores radioactivos terem uma semi-vida relativamente curta é também um inconveniente que vai de encontro ao facto do número de amostras não ser elevado, desperdiçando-se assim dinheiro em reagentes. Outro inconveniente é o tempo despendido nestas determinações. São ensaios demorados que requerem incubações de algumas horas e técnicos com experiência.

Todos estes inconvenientes levam cada vez mais ao abandono dos métodos que utilizam radioisótopos e ao uso mais frequente de métodos automáticos que usam por exemplo quimiluminescência e fluorescência.

Tabela 3 - Tabela indicativa de parâmetros feitos por técnicas manuais no sector de Imunologia/Hormonologia

Produto Biológico	Parâmetro
Soro	Aldosterona, Cromogranina A (CGA), Cromogranina B, Metanefrinas, Normetanefrinas, Testosterona Livre, Dehidroepiandrostenediona, Androstenediona, Factor de Crescimento Insulina-like
Urina	Metanefrinas, Ácido Vanilmandélico, Ácido 5-Hidroxil-Indol-Acético, Iodo, Cortisol

Sistemas automáticos de Imunologia

Tal como foi dito anteriormente neste relatório, a secção de imunologia agrupa uma série de auto-analisadores. Os vários parâmetros doseados estão distribuídos pelos diferentes equipamentos que têm diferentes métodos de detecção dos complexos antigénio-anticorpo. O método escolhido para dosear os diversos parâmetros é baseado numa questão de opção interna com base no rácio qualidade/preço.

Electroquimioluminescência

Dependendo do analito a dosear, assim é o princípio básico do ensaio: competitivo ou *sandwich*.

Técnica de *sandwich*/não competitiva

Este método utiliza dois anticorpos, sendo que o primeiro anticorpo está biotinilado (tem uma molécula de biotina a ele ligado).

Assim, existe uma primeira incubação com a amostra, um anticorpo monoclonal biotinilado específico do antigénio e um segundo anticorpo monoclonal específico do antigénio marcado com complexo de ruténio ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$). Estes compostos reagem entre si e formam um complexo *sandwich*.

Numa segunda incubação há a adição de microsferas, o anticorpo biotinilado liga-se a esta fase sólida pois as microsferas têm à superfície uma molécula de estreptavidina à qual se vai ligar a biotina que está no anticorpo devido à grande afinidade entre a biotina e a

Relatório de Estágio – Mestrado Análises Clínicas - Faculdade de Farmácia – Universidade de Coimbra
estreptavidina. Aqui temos a fase sólida: molécula de estreptavidina ligada ao complexo anticorpo-antigénio-anticorpo ⁽¹⁰⁾.

Técnica competitiva

Este método usa apenas um anticorpo e dois antígenos. Na primeira incubação a amostra reage com o anticorpo monoclonal marcado com um complexo de ruténio e específico do antígeno a dosear. Numa segunda incubação é adicionado o análogo do antígeno, conjugado com biotina e microesferas revestidas com estreptavidina. O anticorpo marcado com ruténio que não se ligou ao antígeno da amostra vai ser capturado pelo antígeno ligado ao complexo biotina-estreptavidina ⁽¹⁰⁾.

Nos dois ensaios a mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo, pois o equipamento tem uma zona magnética que faz com que a microesfera carregada (negativamente) se ligue a essa zona magnética. Os elementos que não estão ligados são removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente eléctrica vai fazer com que haja excitação e transferência de electrões, induzindo então a uma emissão quimioluminescente, que é medida por um fotomultiplicador.

Há uma reacção redox que acaba por excitar a molécula que emite luminescência (Fig. 5) ⁽¹¹⁾.

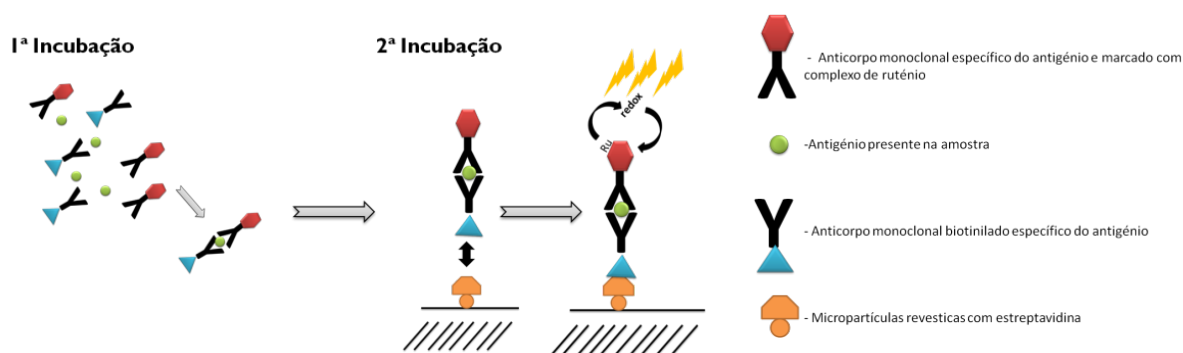


Figura 5 Esquema ilustrativo do método electroquimioluminescente *sandwich*

Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, através de uma calibração de 2 pontos, e numa curva principal incluída no código de barras dos reagentes.

Esta técnica tem sido amplamente utilizada devido à sua elevada sensibilidade, ao pequeno volume de amostra necessário, e aos custos dos testes que são relativamente

baixos. No entanto a utilidade da mesma ainda pode ser muito explorada noutras áreas. Desenvolvimentos com o intuito de minimizar o tamanho do equipamento também estão a ser amplamente alargados para que futuramente se possam fazer, por exemplo, detecções à cabeceira do doente ⁽¹²⁾.

Esta técnica é usada pelo equipamento **cobas e 411, da Roche** (Fig. 6) que doseia os parâmetros assinalados na Tabela 4.



Figura 6 Cobas e 411, da Roche (www.roche.pt)

Tabela 4 - Analitos doseados no Sistema Cobas e 411

Parâmetro Analítico	
Marcadores Tumorais	Antigénio Carbohidrato 125 (CA 125), Antigénio Carbohidrato 19.9 (CA 19.9), Antigénio Carbohidrato 72.4 (CA 72.4), CYFRA 21
Hormonas	FT3, FT4, Paratormona, Insulina, Cortisol Salivar
Outros Parâmetros	Vitamina B12, ácido fólico, peptídeo C, 25- OH- Vitamina D3, e TRAB's (Anticorpos anti-receptores da TSH).

Quimioluminescência

Nos últimos anos o imunoensaio quimioluminescente tem ganho cada vez mais atenção em diferentes campos das ciências da vida, incluindo no diagnóstico clínico, devido à sua alta sensibilidade, boa especificidade e a uma ampla gama de aplicações. Este sistema de análise apresenta rendimentos elevados, tempos curtos, baixos consumos de reagentes e amostras e um custo significativamente baixo ⁽¹³⁾.

Este método utiliza também as técnicas básicas *sandwich* e competitiva. Quando a técnica é competitiva, o análogo do antigénio a dosear é marcado com fosfatase alcalina. No

caso de a técnica ser *sandwich* é o anticorpo secundário que é marcado com o referido enzima⁽⁹⁾.

O sistema Immulite 2000 é um analisador que permite a realização de ensaios imunométricos de vários tipos, por quimioluminescência. O reagente é constituído por uma fase sólida (pérola de poliestireno coberta por anticorpos) e uma fase líquida. A pérola funciona como reservatório para a reacção imunológica, incubação, lavagem e desenvolvimento do sinal de leitura.

Após incubação com a esfera, a amostra sofre uma segunda incubação com a fosfatase alcalina. Entre incubações, o tubo de reacção passa por lavagens sucessivas num espaço de segundos que ocorrem por um sistema de centrifugação, que permite remover excessos de reagentes. No final deste processo, a esfera encontra-se totalmente desprovida de moléculas não ligadas.

A camada ligada à esfera é quantificada usando um substrato quimioluminescente próprio. A reacção quimioluminescente consiste assim na reacção do fosfato de adamantil dioxetano (o substrato) com a enzima fosfatase alcalina. Esta enzima, que se encontra associada ao complexo formado na esfera, desfosforila o dioxetano num intermediário aniónico instável que emite um fóton aquando da sua decomposição. A quantidade de luz emitida será detectada pelo fotomultiplicador e quantificada.

A quantidade de luz emitida será directamente proporcional à quantidade de fosfatase alcalina ligada, nos imunoenaios do tipo *sandwich*, ou inversamente proporcional no caso dos ensaios competitivos⁽¹⁴⁾.

A diferença entre competitivo e *sandwich* não é só no número de anticorpos. Traduz-se também porque a empresa que comercializa o teste fez o estudo de sensibilidade e especificidade. *Sandwich* é mais sensível mas implica que existam vários epítomos imunogénicos, ou seja, tem de existir uma molécula suficientemente grande e com epítomos imunogénicos suficientemente bons para que se possa ter anticorpos contra esses locais da cadeia polipeptídica o que muitas vezes não acontece porque nem todas as proteínas são macromoléculas. Nos ensaios competitivos só é usado um anticorpo. há competição entre a proteína que se quer dosear e um análogo que está marcado, podendo usar-se esta técnica para proteínas mais pequenas que só tenham um local imunogénico. Assim, o tamanho da proteína tem importância na escolha do teste. Muitas vezes a empresa vai preterir o facto da *sandwich* ser mais sensível porque a proteína mais pequena por definição tem de seguir para

a RIA e a técnica competitiva perde sensibilidade, na *sandwich* há dois anticorpos e um é monoclonal, havendo aumento da sensibilidade.

Neste autoanalisador (Fig. 7) são doseados os analitos referenciados na tabela 5.



Figura 7 Sistema Automático Immulite 2000, da Siemens

Tabela 5 - Analitos doseados no Sistema Automático Immulite 2000

	Parâmetro Analítico
Marcadores Tumorais	Antigénio Carcinoembrionário (CEA), Alfa-fetoproteína (AF), β 2-Microglobulina (BMG), Antigénio específico da Próstata (PSA) Total e Livre
Hormonas	Hormona Tireotrófica, T3 Livre, T4 Livre, T3 Total, T4 Total, Tiroglobulina (TG), Calcitonina, Paratormona, Hormona Adrenocortical, Hormona de Crescimento, Hormona Fulículoestimulante, Hormona Luteínica, Prolactina, Progesterona, Estradiol, Hormona Gonadotrófica Coriónica, Cortisol, SO4 – dihidro – epiandrostenediona, Eritropoietina e Gastrina
Outros Parâmetros	Anticorpos anti - TG, Anticorpos anti-peroxidase, Factor de Crescimento Insulina-Like (IGF I), IGF I- <i>Binding</i> <i>Protein</i> (BP3)

TRACE

Trace é a tecnologia utilizada pelo equipamento B · R · A · H · M · S KRYPTOR (Fig. 8).

A base da tecnologia TRACE é a transferência de energia não radioactiva que ocorre entre dois marcadores fluorescentes.

O dador (criptato) e o receptor, (XL 665 – um fluorocromo) têm uma proximidade física necessária para este tipo de interacção. Quando o imunocomplexo se forma, tendo

como “ponte” o antigénio, o fluorocromo aceitador é eficazmente excitado. A formação do complexo antigénio-anticorpo e a consequente transferência de energia do criptato para o XL665 permite o prolongamento temporal e a intensificação do sinal de fluorescência do XL665.

A intensidade do sinal obtido é proporcional à concentração do antigénio. Os sinais de fluorescência do aceitador e do dador são medidos simultaneamente a 665nm e 620nm. Dessa forma pode ser calculada a razão das intensidades da luz emitida em ambos os comprimentos de onda (665/620), o que permite uma correcção directa das diferenças na transmissão óptica do meio.

Devido a uma análise cinética das primeiras medições, amostras altamente concentradas já são reconhecidas pouco depois do início da incubação, sendo automaticamente diluídas e depois analisadas novamente.

O antigénio a dosear está ligado entre ambos os anticorpos de acordo com o método *sandwich* ^(15;16).

O Kryptor doseia os marcadores tumorais: Antigénio Carbohidrato 15.3 (CA 15.3), Enolase Neuroespecífica (NSE), Antigénio do Carcinoma de células escamosas (SCC) , CGA e PSA Total.



Figura 8 Equipamento Kryptor

Imunoturbidimetria

O Konelab (Fig. 9) utiliza a imunoturbidimetria como técnica para fazer a determinação de uma grande variedade de parâmetros.

Um antisoro específico é adicionado em excesso às amostras. O aumento da absorvência é causado pela formação de imunocomplexos entre o analítico medido e o anticorpo específico, sendo medida até a reacção atingir o seu ponto final. A diferença de absorvências é tanto maior quanto maior for a quantidade de antigénio na solução ⁽¹⁷⁾.

No sector de Imunologia este equipamento é utilizado para a quantificação de imunoglobulinas e determinação da PCR.



Figura 9 Equipamento Konelab 60i

Marcadores Tumorais

Um marcador tumoral pode ser definido como um amplo espectro de moléculas de características muito variáveis, produzidas ou induzidas pela célula neoplásica que reflectem o seu crescimento e a sua actividade ⁽¹⁸⁾.

A maioria dos marcadores tumorais não são usados na detecção precoce da malignidade. Contudo, em pacientes já diagnosticados com doença maligna os marcadores tumorais são úteis na determinação do prognóstico prevendo a resposta terapêutica e mantendo a vigilância após uma cirurgia. Têm também grande utilidade na monitorização da terapêutica na doença avançada ⁽¹⁹⁾.

De acordo com esta definição são muitos os parâmetros que podem ser considerados marcadores tumorais, como sejam enzimas, hormonas, antígenos de função desconhecida, oncoproteínas, etc.... ⁽¹⁸⁾.

Seguem-se algumas especificações acerca dos principais marcadores tumorais utilizados.

Antigénio Carbohidrato 125

É uma glicoproteína de elevado peso molecular ⁽¹⁸⁾, encontrada em grande concentração nas células cancerígenas do ovário. Pode ser encontrada em concentrações elevadas no soro de 80% de mulheres com estágio avançado de tumor no ovário ⁽²⁰⁾.

Níveis muito elevados de CA 125 podem encontrar-se em patologias associadas a retenções de líquidos como derrames pleurais e pericárdicos ou síndrome nefrótica. Aumentos moderados detectam-se em algumas situações como alguns miomas uterinos,

quistos ováricos, peritonites e insuficiência renal. Ainda, pequenos aumentos podem ser encontrados em mulheres durante a menstruação ⁽¹⁸⁾.

O CA125 pode ser usado para diferenciar massas pélvicas benignas e malignas numa mulher pós-menopausica, tendo sido recomendado recentemente pela *European Group on Tumor Markers* (EGTM). De acordo com estudos feitos, casos com níveis elevados (> 35 U/mL) de CA 125 devem ser encaminhados para o clínico fazer avaliação periódica ⁽¹⁹⁾.

Antigénio Carbohidrato 15.3

A molécula detectada no ensaio de CA 15.3 é a forma solúvel da proteína MUC-I ⁽²¹⁾.

A sua principal utilidade clinica é na monitorização dos carcinomas mamários, mas também podem existir níveis elevados em outras neoplasias epiteliais, principalmente em carcinomas ováricos, tumores do endométrio e carcinomas do pulmão de células pequenas. Pequenos aumentos podem detectar-se em algumas situações benignas principalmente hepáticas e renais ⁽¹⁸⁾.

Antigénio Carbohidrato 19.9

O CA 19.9 é o principal marcador do carcinoma do pâncreas e do carcinoma das vias biliares, tornando-se também o padrão para prever uma recidiva do tumor pancreático durante o *follow-up* ⁽²²⁾. No entanto este marcador tem limitações importantes. Não é um marcador específico do cancro do pâncreas e os níveis de CA 19.9 podem estar elevados noutras condições benignas como a colestase. Além disso, há também pacientes com cancro pancreático que têm níveis indetectáveis de CA 19.9 ⁽²³⁾.

Antigénio Carbohidrato 72.4

O CA 72.4, em associação com o CEA, é o marcador de primeira escolha para o carcinoma do estômago. Aparece aumentado no carcinoma do ovário, juntamente com o CA 125 ⁽²⁴⁾.

Este marcador tem uma especificidade muito elevada, detectando-se poucos falsos positivos ⁽¹⁸⁾.

CYFRA 21.1

O CYFRA 21.1 é um marcador tumoral sensível no cancro do pulmão não-microcítico ou seja no *Non-Small Cell Lung Cancer* (NSCLC). É útil na clínica para fazer a monitorização da terapia e acompanhamento de doentes que padecem deste cancro ⁽²⁵⁾. Pode apresentar um aumento não específico em situações de hepatopatias e insuficiência renal ⁽²⁶⁾.

Enolase Neuro Específica

A NSE é uma enzima glicolítica normalmente presente nos neurónios, tecidos nervosos periféricos e tecidos neuroendócrinos. Tem utilidade para fazer o acompanhamento e controlo da terapia no cancro do pulmão de pequenas células. Também tem função de marcador tumoral em alguns tumores de origem neuroendócrina podendo ser assim usada para acompanhamento e controle da terapia em neuroblastomas ⁽²⁶⁾.

Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas

O SCC não é um marcador tumoral muito específico, podendo ser detectado em tecidos escamosos normais como sejam o cérvix, a vagina, a vulva, o esófago, etc. No entanto o SCC é útil na detecção de recidiva do cancro do colo do útero, do esófago e do pulmão (aplica-se ao carcinoma que não afecta as pequenas células do pulmão, NSCLC) ⁽¹⁸⁾.

Antigénio Carcinoembrionário

O CEA é utilizado na vigilância de pacientes diagnosticados com cancro colorrectal. É também um marcador complementar, quando associado a outros marcadores tumorais, dos carcinomas da mama, pulmão, ovário, estômago, pâncreas, tiróide e fígado ⁽¹⁹⁾.

Pequenos aumentos deste marcador tumoral podem ser encontrados em indivíduos fumadores e em situações benignas como a cirrose hepática, insuficiência renal, colite ulcerosa e quistos ováricos ⁽¹⁸⁾.

Este marcador é útil para ajudar a definir o estadiamento da doença maligna. Permite efectuar o controlo da evolução da doença e a avaliação da eficácia terapêutica.

Alfa-fetoproteína

A AFP é uma glicoproteína com uma composição proteica muito similar à albumina. É o marcador de carcinomas hepatocelulares, e em associação com a β -hCG é o marcador dos tumores germinais. Usa-se no seguimento da terapia e monitorização do curso dos referidos tumores. Aumenta inespecificamente em muitas patologias hepáticas não neoplásicas como a cirrose hepática, hepatites agudas e crónicas, e também em neoplasias gastrointestinais ⁽¹⁸⁾.

Subunidade Beta da Gonadotrofina Coriónica Humana

A β -hCG é a fracção beta da hormona gonadotrofina coriónica humana, juntamente com a AFP é o marcador de tumores trofoblásticos e neoplasias germinais do testículo e ovário.

Faz diagnóstico diferencial em tumores germinais: no coriocarcinoma puro e em tumores do saco vitelino. Permite avaliar a eficácia do tratamento. Existem falsos positivos numa situação de gestação ⁽²⁷⁾.

B2-microglobulina

Marcador tumoral do mieloma múltiplo, do linfoma de células B e da leucemia linfocítica crónica. Pode ser utilizada para fazer o prognóstico da progressão da doença e a monitorização do tratamento. Para interpretação dos resultados a função renal deve ser sempre considerada pois em situações de insuficiência renal existe um aumento deste marcador ⁽²⁸⁾.

Cromogranina A

A CGA é uma proteína presente em vários tecidos neuroendócrinos. É um marcador tumoral com utilidade em neoplasias endócrinas, tipo feocromocitoma, síndrome carcinóide, carcinoma medular da tiróide, adenoma hipofisário, carcinoma de células dos ilhéus do pâncreas e na neoplasia endócrina múltipla.

Os níveis de CGA sérica estão elevados em 56 a 100% dos pacientes com tumores carcinóides, e estes níveis correlacionam-se com o tamanho do tumor. Os níveis plasmáticos de NSE também são usados como marcadores para os tumores carcinóides, mas são menos específicos que a CGA, estando elevados somente em 17 a 47% dos pacientes ⁽²⁹⁾.

Antigénio Específico da Próstata

O PSA é o marcador tumoral do carcinoma da próstata, e é dos poucos marcadores tumorais que podem ser utilizados como elemento de diagnóstico, e usado no rastreio ⁽³⁰⁾. O PSA circula ligado a proteínas inibidoras das proteases séricas, permanecendo uma pequena fracção no estado livre (PSA livre). A percentagem de PSA livre varia em função da patologia prostática, sendo menor em pacientes com cancro da próstata do que indivíduos normais ou com patologia benigna ⁽¹⁸⁾.

A percentagem de PSA livre, calculada pela fórmula $\frac{[PSA\ livre]}{[PSA\ total]} \times 100$, permite distinguir duas situações clínicas. O rácio é menor em doentes com cancro, comparado com aqueles portadores de hiperplasia benigna da próstata (HBP). Este conceito assume especial importância nos valores de PSA total entre 2,6 e 4 ng/ml, permitindo aumentar a especificidade em 20 a 40%, com perda moderada de sensibilidade (5-10%). Utilizando este teste evita-se a realização de biópsias desnecessárias. Na prática, em cada cinco biópsias

negativas efectuadas, uma ou mais poderão ser evitadas pela sua utilização. O uso combinado do PSA livre com o PSA total revela-se muito útil na detecção de carcinomas da próstata clinicamente significativos, sobretudo usando um cut-off de PSA total mais baixo ⁽³⁰⁾.

Calcitonina

A Calcitonina é o marcador tumoral das células C da tiróide, sendo que altos níveis podem sugerir carcinoma medular da tiróide. Os níveis de calcitonina podem relacionar-se com a extensão da doença, nomeadamente com o volume do tumor e a presença de metástases. É útil como auxiliar de diagnóstico, para monitorização do tratamento e prognóstico. Pode apresentar uma concentração elevada em casos de insuficiência renal, doenças pulmonares, pancreatite, hiperparatiroidismo, anemia perniciosa, e doença de Paget's ⁽³¹⁾.

Os valores de referência dos marcadores tumorais variam consoante o equipamento utilizado. Há que ter então em conta, na validação dos resultados, qual o sistema automático em uso. Daqui também se revela a importância que tem um paciente que está em *follow up*, fazer os testes sempre no mesmo laboratório, para que se possa monitorizar o doente.

Electroforese no sistema Hydrasis

Para fazer a electroforese de proteínas séricas é utilizado no laboratório o aparelho semi-automático HYDRASYS. O sistema HYDRASYS destina-se à separação electroforética em géis de agarose e permite realizar todas as sequências até à obtenção do gel para interpretação qualitativa, começando na aplicação das amostras, passando pela migração electroforética, secagem, aplicação de corante, remoção de corante e secagem final. Seguidamente, as bandas obtidas são quantificadas por um sistema de digitalização, através de densitometria. Ao utilizar gel de agarose obtem-se uma resolução das bandas muito melhor do que com acetato de celulose ⁽³²⁾.

Neste laboratório existem kit's para realizar proteinogramas, imunofixações, pesquisa de proteína de Bence Jones, separação de hemoglobinas, identificação e quantificação de diferentes isoenzimas da fosfatase alcalina, e a separação das 5 isoenzimas da lactato desidrogenase (LDH). No entanto aqui vou especificar apenas o que se usa mais na rotina laboratorial.

O produto biológico usado é o soro que se obtém através da centrifugação do sangue total, colhido sem anticoagulante, durante 10 minutos a 3000 rpm.

Electroforese de proteínas séricas

A electroforese de proteínas séricas é um método que permite separar proteínas do plasma humano em fracções, com vista à detecção de anomalias no perfil proteico. A interpretação que daqui resulta é útil para a investigação e diagnóstico de diversas doenças ⁽³³⁾. É também uma ferramenta útil na monitorização de alterações malignas, indica processos inflamatórios agudos e crónicos, doenças hepáticas, deficiências de anticorpos, diferencia gamopatias monoclonais e policlonais, para além de permitir monitorizar respostas à terapia ⁽³⁴⁾.

Esta técnica baseia-se nos princípios da electroforese de zona executada num suporte adequado. A agarose tem sido utilizada por ser um meio de suporte versátil e eficaz. Para determinação na rotina as proteínas são separadas apenas em cinco fracções de mobilidade diferente, de acordo com a sua carga a um determinado pH ⁽³⁵⁾. As proteínas separadas são coradas com negro de amido e o excesso de corante eliminado em meio ácido.

As proteínas apresentam mobilidade electroforética diferente, e assim a separação das proteínas permite a formação de bandas denominadas de: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, betaglobulina e gamaglobulina, como se pode ver na figura 10. Da quantificação resulta um gráfico que, em situações normais é semelhante ao da figura 11 ⁽³²⁾. O conhecimento dos principais componentes de cada banda electroforética facilita o raciocínio clínico e auxilia na identificação de padrões electroforéticos, característicos de algumas doenças ⁽³³⁾.

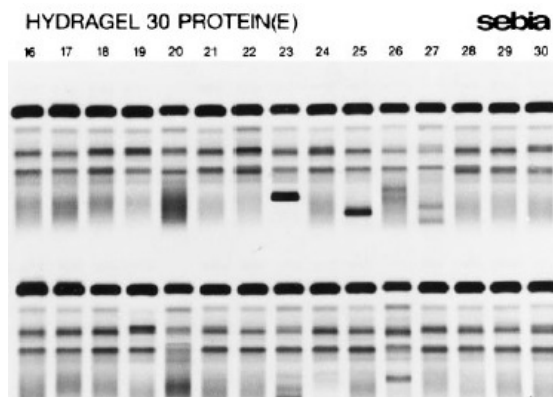


Figura 10 Proteinograma em gel de agarose, utilizando o Hydrasys ⁽³²⁾

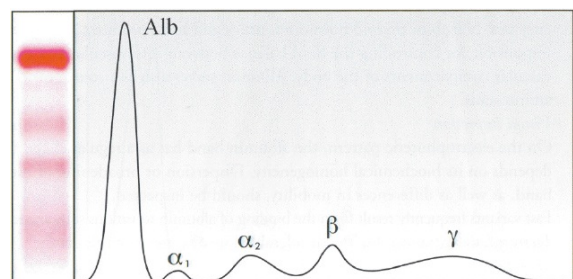


Figura 11 Gráfico de corrida electroforética normal ⁽³³⁾

Intepertação do proteinograma

Albumina

É a proteína mais abundante no plasma e corresponde a cerca de 60% da concentração total de proteínas ⁽³⁶⁾.

A diminuição da concentração de albumina é uma condição altamente inespecífica e acompanha inúmeras doenças. Esta hipoalbuminémia acontece em situações que promovam a sua perda (por meio dos glomérulos renais e intestinos), baixa ingestão proteica, em situações de elevado catabolismo (infecção bacteriana grave, neoplasias malignas, insuficiência cardíaca congestiva, doenças inflamatórias e infecciosas crónicas), ou em situações de síntese prejudicada como sejam a cirrose hepática e hepatite viral. O aumento desta proteína acontece em casos de desidratação devido a uma perda consecutiva de água (sudorese excessiva, diarreia, vômito) ⁽³²⁾.

α -I Globulinas

Este grupo é constituído por um conjunto de várias proteínas, de entre as quais a α I-antitripsina que corresponde a 90% do pico normal da α I-globulina.

Em geral há um aumento desta fracção em processos inflamatórios, infecciosos e imunes de forma inespecífica (são proteínas de fase aguda) ⁽³³⁾.

Esta proteína é codificada por dois alelos denominados M e Z. Pacientes com homozigotia Z geram um decréscimo nos níveis séricos de α I- antitripsina o que leva a um elevado risco de desenvolver doença pulmonar, e está também relacionado com uma forma progressiva de cirrose ⁽³⁷⁾.

Assim diante da ausência ou diminuição deste pico são necessários testes mais específicos.

α -2 Globulinas

A banda alfa-2 é constituída por um grupo variado de proteínas, entre elas a haptoglobina, a alfa-2-macroglobulina, a ceruloplasmina, a eritropoetina e a colinesterase. Estas proteínas são também proteínas de fase aguda, podendo aparecer aumentadas em presença de infecção, processos inflamatórios e imunes.

A α -2-macroglobulina e a haptoglobina correspondem à maior parte desta banda.

A haptoglobina migra mais lentamente que a α -2-macroglobulina e tem função de se ligar à hemoglobina circulante, permitindo que o complexo haptoglobina-hemoglobina seja

rapidamente removido. Num quadro de hemólise intravascular, onde há um importante gasto desta proteína, os níveis estão diminuídos.

A α -2-macroglobulina é uma das maiores proteínas globulínicas presentes no plasma e a sua concentração pode elevar-se 10 vezes ou mais na síndrome nefrótica, quando são perdidas as outras proteínas de peso molecular mais baixo ⁽³³⁾.

β – Globulinas

Esta banda é composta por um grupo heterogéneo de proteínas, de onde se destacam as beta-lipoproteínas, a transferrina e o componente C3 do complemento.

Pode acontecer diminuição desta banda devido a insuficiência hepatocelular ou desnutrição, mas normalmente é raro. O aumento pode estar relacionado com anemia ferropriva (β 1 – aumento da síntese de transferrina com padrão electroforético mais rápido)⁽³³⁾, pode também haver uma hiperglobulinémia β 2 devido a por aumento do componente C3 do complemento de origem inflamatória ou secundária a uma obstrução biliar intra ou extra hepática. A presença de proteína de Bence-Jones, a qual também pode migrar na zona, também pode fazer aumentar a banda ⁽³⁸⁾.

Gama – Globulinas

Esta fracção é constituída por imunoglobulinas que são os anticorpos produzidos pelos plasmócitos, quando estimulados por antígenos ou devido à desordem clonal maligna dessas células ⁽³³⁾. Há diferentes classes, todas elas formadas por duas cadeias pesadas (IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE, correspondendo a IgG a 80% das gamaglobulinas ⁽³⁴⁾) e duas cadeias leves (kappa ou lambda) ⁽³³⁾ (Fig. 12).

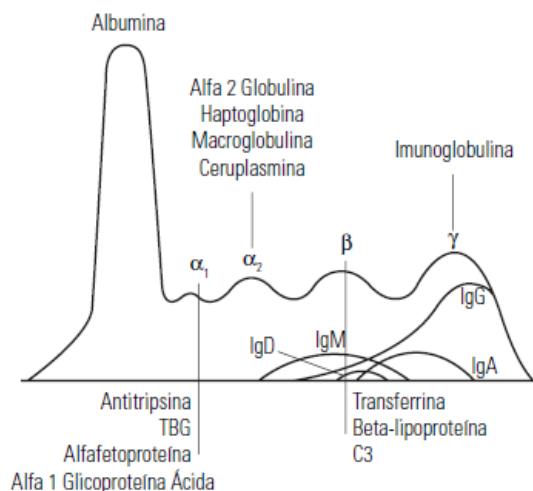


Figura 12 Principais proteínas encontradas em cada fracção electroforética (com destaque para as Ig's) ⁽³³⁾

Apenas a IgG apresenta migração por toda a banda da fracção de gamaglobulinas. Assim, as alterações nessa banda reflectem o que ocorre com esta imunoglobulina. A IgA encontra-se na área de junção com a fracção betaglobulina. A IgM, por sua vez, migra na região localizada entre a IgA e a IgG e é detectada quando estimulada (infecções agudas) ⁽³²⁾.

Gamapatias policlonais

O aparecimento de um pico policlonal representa uma resposta imunológica de diversos clones plasmocitários a determinado estímulo antigénico. Este padrão aparece como aumento difuso da fracção gama, representado pela presença de uma curva de base larga, demonstrando assim a produção de todas as classes de imunoglobulinas. Os estímulos podem ser inflamatórios, imunes ou infecciosos.

Gamapatias monoclonais

As gamapatias monoclonais, constituem um grupo de patologias caracterizado pela proliferação de um clone de células plasmáticas que produz uma proteína monoclonal (proteína M) ⁽³⁹⁾. Produzem e secretam imunoglobulina (Ig) ou fragmentos de Ig, que resulta num aumento homogéneo da fracção gama, levando à produção de uma curva de base estreita conhecida como pico monoclonal. A identificação do componente monoclonal é essencial para o diagnóstico, o prognóstico, o tratamento e a avaliação da eficácia do tratamento das gamapatias monoclonais ⁽⁴⁰⁾.

Podem então existir hipergamaglobulinémias monoclonais, presentes em doenças linfoproliferativas, tais como a gamapatia monoclonal de significado indeterminado, mieloma múltiplo, amiloidose e macroglobulinémia de Waldenstrom ⁽⁴¹⁾. Hipergamaglobulinémias policlonais todas as vezes que se verificar uma reacção inflamatória, imune ou infecciosa. A hipogamaglobulinémia é verificada em anomalias congénitas, em processos patogénicos que trazem destruição do sector linfóide, numa variação de cadeia leve do mieloma múltiplo (existência de proteinúria de Bence Jones), e pode ser secundária a corticóides, imunossuppressores, quimioterapia ou radioterapia. Em situações de cirrose alcoólica pode ser observada uma ponte beta-gama ⁽³⁸⁾.

De acordo com estudos realizados a média de idades onde são diagnosticadas gamapatias monoclonais é de 65 anos, em que apenas 2 a 4% dos casos totais se apresentam em pessoas com idade inferior a 40 anos. A proporção Homem/Mulher é de 2:1 ⁽⁴²⁾.

Apesar do mieloma múltiplo ser o “protótipo” da gamapatia monoclonal, a desordem mais comum das células plasmáticas é a Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI), onde é encontrada uma imunoglobulina monoclonal no soro com uma concentração inferior a 3 g por decilitro, com ausência de lesões ósseas, anemia, hipercalcémia e insuficiência renal relacionada com a proliferação monoclonal das células plasmáticas. Um paciente com GMSI requer um *follow-up* ilimitado, pois existem factores de risco para que evolua para uma condição maligna ⁽⁴³⁾.

Imunofixação

Após a detecção de um pico ou banda monoclonal numa electroforese de proteínas, deverá ser realizada uma imunofixação para confirmar a presença de proteína M e identificar o tipo de cadeias presentes ⁽⁴¹⁾.

As proteínas são separadas por electroforese em meio alcalino (pH 9,1) e depois imunoprecipitadas com antisoros de especificidades diferentes: anti-cadeias pesadas gama (Ig G), alfa (Ig A) e mu (Ig M), e anti-cadeias leves kappa e lambda (livres e ligadas). Após imunofixação, as proteínas imunoprecipitadas são coradas com negro de amido ou violeta ácido. O excesso de corante é eliminado em meio ácido ⁽⁴⁴⁾.

Na presença de componente monoclonal é identificada uma banda bem definida associada a uma classe de cadeia pesada (IgM, IgG e IgA) e uma banda com o mesmo padrão de migração em relação às cadeias leves (kappa e lambda), como é possível observar na figura 13 ⁽³⁸⁾.

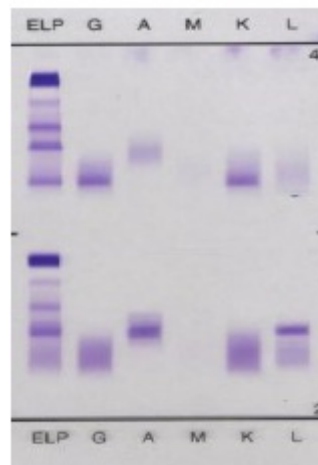


Figura 13 Imunofixação sérica de pacientes com gamopatias monoclonais IgG kappa e IgA lambda ⁽³⁸⁾

Em alguns casos, as células produzem apenas cadeias leves livres, geralmente detectadas na urina e conhecidas como proteínas de Bence-Jones ⁽⁴²⁾.

Segundo vários estudos, as cadeias pesadas com mais prevalência são a IgG (em mais de metade dos casos), seguindo-se a IgM e a IgA. Em relação às cadeias leves, as cadeias kappa ocupam o lugar de maior prevalência com aproximadamente 60% dos casos, contra as cadeias lambda com aproximadamente 40% (42; 43).

Alguns exemplos práticos de Gamapatias

Estes exemplos são casos que foram estudados no sector de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E. durante o meu período de estágio.

Caso I –

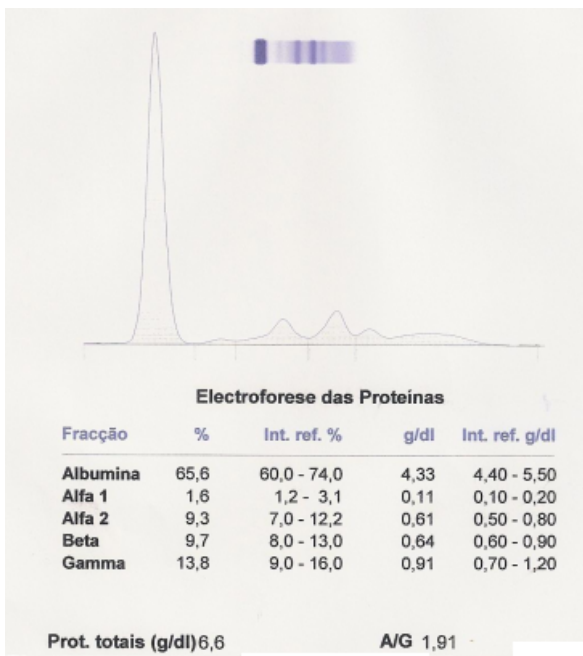


Figura 14 Electroforese de Proteínas do Caso I

O resultado da imunofixação revelou a presença de uma banda monoclonal IgA Lambda.

No proteinograma (Fig. 14) verifica-se a presença de uma banda monoclonal na zona gama, que corresponde a um pico que se pode encontrar no gráfico. Apesar das percentagens das diferentes classes de proteínas estarem dentro dos valores normais, bem como o valor absoluto das mesmas, a presença desta banda monoclonal necessita que se faça uma imunofixação sérica (Fig. 15).

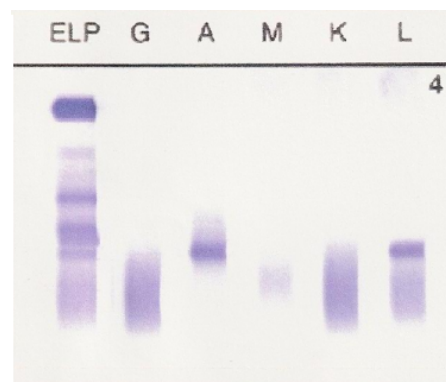


Figura 15 Imunofixação de proteínas séricas realizado no Caso I

Caso 2 –

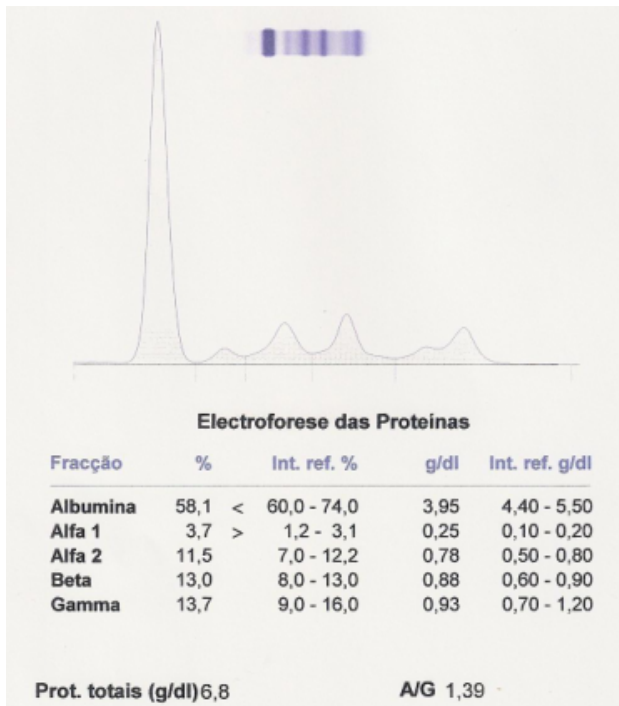


Figura 16 Electroforese de Proteínas do Caso 2

A imunofixação revelou a presença de um banda IgG Lambda e uma IgG Kappa.

O traçado electroforético (Fig. 16), revelou a presença de duas bandas monoclonais. Como é visível no gráfico há uma biconalidade da zona gama. Pode-se verificar também que há um decréscimo no valor de albumina, compensado pelo aumento dos valores da alfa-I, mas estas diferenças não são significativas. As duas bandas monoclonais foram posteriormente caracterizadas por imunofixação (Fig. 17).

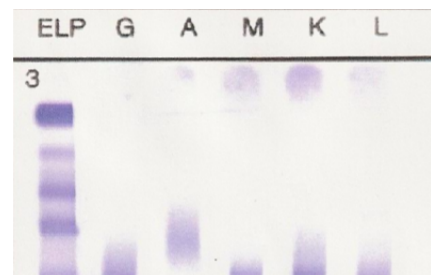


Figura 17 Imunofixação de proteínas séricas realizado no Caso 2

Caso 3 –

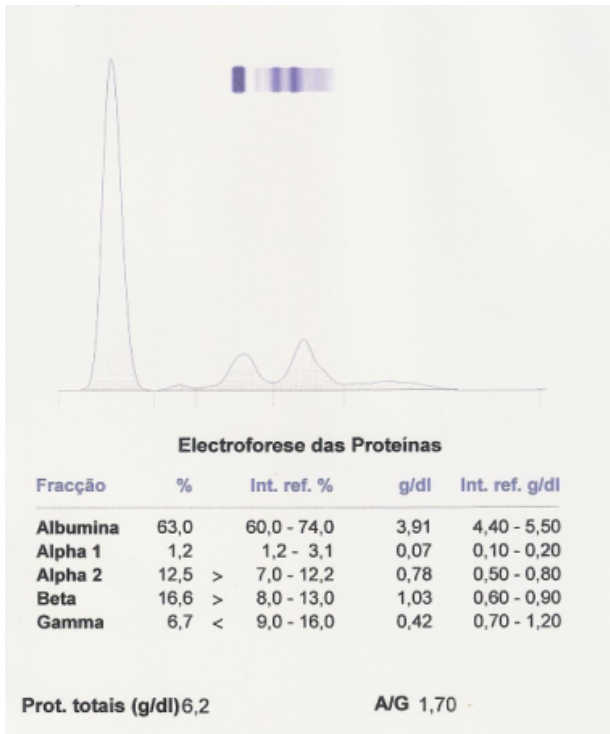


Figura 18 Electroforese de Proteínas do Caso 3

Nesta análise de proteínas séricas (Fig.18), pode-se ver um aumento das fracções alfa-2 e beta e uma diminuição na fracção gama. Apesar de não se ver alteração na banda gama, a alteração dos valores implica que se faça imunofixação de proteínas séricas para averiguar (Fig. 19).

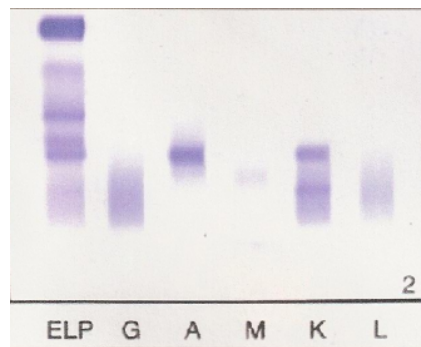


Figura 19 Imunofixação de proteínas séricas realizado no Caso 3

Verifica-se a presença de uma banda monoclonal IgA Kappa associada e uma cadeia Kappa sem correspondência. Quando não existe correspondência de cadeias leves o procedimento que se segue é fazer a pesquisa de proteína de Bence Jones e também da IgD e IgE (Fig. 20).

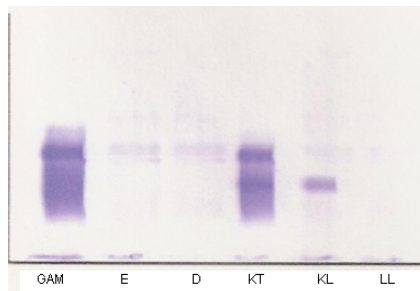


Figura 20 Pesquisa de Bence Jones no Caso 3

Não são encontradas IgE e IgD, mas consegue-se ver a correspondência de cadeias leves livres Kappa.

Hematologia

Este sector encontra-se dividido em duas salas. Na sala principal são feitos os hemogramas no LH 750 da Beckman Coulter, a velocidade de sedimentação (VS) no Alifax Test I BCL, bem como os esfregaços que são necessários e as respectivas colorações. Numa segunda sala pertencente ao sector, são feitas as provas de coagulação no TOP500 da Instrumentation Laboratory, e a citometria de fluxo no citómetro FC500 da Beckman Coulter. Existe ainda um termociclador, Gene Xpert, para pesquisa do gene de fusão Bcr-Abl e factor V de Leiden. Para a realização dos hemogramas, velocidade de sedimentação e provas de coagulação existem dois equipamentos de cada, alternando-se diariamente o uso destes.

Durante o período que permaneci neste sector integrei a rotina do mesmo manuseando os diferentes equipamentos que equipam o Sector de Hematologia, tanto ao nível do processamento de amostras como na sua manutenção. Da rotina do sector fazem também parte a execução e observação de esfregaços de sangue periférico, onde participei activamente. Para além das técnicas de rotina pude também contribuir para a execução de amostras por citometria de fluxo, nomeadamente na sua marcação através de anticorpos monoclonais.

A Hematologia é uma área com extrema relevância para os clínicos, pois aborda o estudo de células sanguíneas e sua produção. Para além de estudar o estado de normalidade dos elementos sanguíneos e dos órgãos hematopoiéticos, estuda também as doenças com eles relacionados ⁽⁷⁾. Neste Serviço a área de Hematologia reveste-se de uma acentuada importância, pois estando o Serviço integrado num Hospital Oncológico existe a necessidade de avaliação de doentes previamente aos tratamentos, para que assegure as condições de suporte por modo a evitar reacções adversas nefastas.

O sangue é composto por células sanguíneas em suspensão no plasma. Estas células têm um tempo de vida limitado estando continuamente a ser substituídas por novas células produzidas num processo conhecido por hematopoiese, que ocorre no estroma da medula óssea. A célula estaminal hematopoiética pluripotente está na base de todas as células sanguíneas e quando se multiplica origina células com as mesmas propriedades e células diferenciadas em duas linhagens: célula estaminal linfóide (linfócitos T e B) e célula estaminal mielóide. A célula estaminal mielóide diferencia-se, originando neutrófilos, eosinófilos e basófilos que são granulócitos, monócitos, eritrócitos e plaquetas. Citocinas e factores de

crescimento suportam a sobrevivência, proliferação e diferenciação de cada tipo de célula^(45;46).

Procedimentos de rotina no Sector de Hematologia

Hemograma e Esfregaço Sanguíneo

Das normas do Serviço fazem parte a identificação das amostras colhidas em tubo de EDTA-K3 com recurso a um número diário, usando etiqueta de código de barras, para fácil leitura nos equipamentos automatizados. É no equipamento automático LH 750 da Beckman Coulter que se faz a contagem das células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas, assim como o doseamento da hemoglobina.

Sempre que necessário é efectuado esfregaço de sangue periférico e a observação ao microscópio óptico com contagem manual do diferencial leucocitário e observação da morfologia celular.

O hemograma é o exame laboratorial mais requisitado e mais completo em hematologia. Este exame abrange a contagem de células brancas, vermelhas, plaquetas e reticulócitos (quando pedido especificamente pelo clínico), dando assim informações acerca do número e morfologia das células⁽⁴⁷⁾.

O aparecimento de sistemas automatizados trouxe vantagens nomeadamente em relação à rapidez de obtenção de resultados assim como na reprodutibilidade dos memos. Assim com o recurso a estes equipamentos é possível uma análise de um fluxo de amostras muito maior num curto espaço de tempo bem como uma drástica diminuição dos erros da fase analítica, pois reduz a intervenção dos técnicos durante o processo. A contagem de células por impedância foi primeiramente descrita por Wallace Coulter em 1956⁽⁴⁸⁾.

O LH 750 da Beckman Coulter utiliza o **Princípio de Coulter**, que se baseia na **tecnologia VSC** (acrónimo de Volume, Condutividade e Dispersão), a ferramenta mais eficaz disponível para a análise de células sanguíneas. Esta tecnologia oferece grande sensibilidade, especificidade e eficiência.

Para a execução do Hemograma o equipamento utiliza reagentes como o Erythrolyse™ e o Stabilyse™ que são misturados com a amostra de sangue numa câmara de mistura orbital para remover as células vermelhas, enquanto que os glóbulos brancos permanecem inalterados. O Erythrolyse é utilizado para lisar os glóbulos vermelhos e o

Stabilyse é posteriormente adicionado para parar a reacção lítica, deixando os leucócitos prontos para a análise.

Esta tecnologia utiliza um citómetro de fluxo modificado para proporcionar mais informação sobre as células não coradas do que é possível usando apenas a dispersão de luz. O sistema contém uma célula de fluxo de cristais de quartzo que permite que os leucócitos passem um de cada vez no sistema de detecção usando focagem hidrodinâmica (Fig. 21).

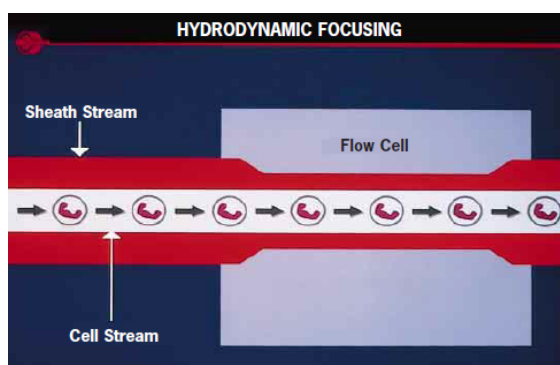


Figura 21 Esquema de Focagem hidrodinâmica utilizado na tecnologia VCS ⁽⁴⁷⁾

A tecnologia VCS usa um único canal que utiliza três fontes de energia independentes para detectar até 8192 células sanguíneas na célula de fluxo. Esta combinação do volume, condutividade e dispersão permite avaliar directamente as 5 classes de leucócitos ^(49; 50).

O recurso à observação de esfregaço de sangue periférico ocorre quando há características clínicas que deixam algumas dúvidas em relação aos resultados (por exemplo quando não vai de encontro ao histórico do doente) ou quando há uma anormalidade na contagem automática sendo que nestas situações o equipamento emite alarmes pré-programados ⁽⁵¹⁾. O esfregaço pode ser feito por um TAC, mas é política do serviço que a observação microscópica seja feita por um TSAC especialista.

Eritrograma

Eritrócitos

A principal função dos eritrócitos maduros é a oxigenação dos tecidos, realizada através da molécula da hemoglobina. A sua maturação ocorre na medula óssea passando pelas diferentes fases, desde o proeritroblasto, eritroblasto basófilico, eritroblasto policromático, normoblasto, reticulócito e eritrócito. A produção de eritrócitos – eritropoiese – é estimulada pela eritropoietina que é secretada pelos rins.

Existem patologias que interferem com a normal eritropoiese provocando variações na forma, conteúdo em hemoglobina e no tamanho dos eritrócitos.

Varição na forma (poiquilocitose): Os eritrócitos normalmente têm forma de disco bicôncavo, contudo podem apresentar outras formas, sendo que se houver uma prevalência de algumas destas formas é indicativo de algumas patologias. Esta análise é feita através da observação do esfregaço de sangue periférico.

Conteúdo em Hemoglobina: O conteúdo em Hb pode variar em situações patológicas. Assim os eritrócitos com níveis normais de Hb designam-se normocrômicos, sendo hipocrômicos os que apresentam níveis baixos de Hb e por analogia hiperocrômicos os eritrócitos que apresentam níveis elevados de Hb.

Tamanho dos eritrócitos (anisocitose): Normalmente os eritrócitos apresentam um tamanho uniforme. Contudo podem aparecer eritrócitos mais pequenos (micrócitos) ou maiores (macrócitos) que o normal. Esta variação no tamanho está, em regra, associada a patologias. Os micrócitos podem surgir por exemplo em anemias por deficiência de ferro ou anemias hemolíticas. Os macrócitos aparecem associados a patologias hepáticas, anemias por deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico e anemias megaloblásticas, entre outras. A interpretação da variação do tamanho dos eritrócitos deve ter em conta a idade e etnia do indivíduo já que os eritrócitos das crianças são menores do que os dos adultos, enquanto que no recém-nascido apresentam tamanho superior. Já os negros têm eritrócitos menores que os caucasianos ⁽⁷⁾.

Particularidades dos eritrócitos

Apesar dos eritrócitos poderem apresentar diversas particularidades, vou apresentar apenas aquelas que tive oportunidade de observar no decorrer do estágio.

Corpos de Howell-Jolly – são fragmentos nucleares redondos de cor azul escura (coloração de Wright), resultantes de DNA condensado, normalmente removidos pelo baço. Frequentes em anemias hemolíticas severas, pacientes com disfunção do baço ou após esplenectomia.

Ponteado Basófilo – São agregados de RNA sob a forma de grânulos (púrpura) distribuídos pela célula. Podem resultar de exposição a algumas drogas, septicémia, algumas anemias ou queimaduras graves.

Formação de Rouleaux – Ocorre quando os eritrócitos ficam empilhados. Pode ocorrer pela presença de altas concentrações de globulinas ou fibrinogénio no plasma. Estas formações de eritrócitos são encontradas em casos de mieloma múltiplo, macroglobulinemia e podem também ser encontradas na gravidez onde há aumento do fibrinogénio. Há que ter atenção para não confundir com artefactos que aparecem nos bordos dos esfregaços.

Aglutinação dos eritrócitos – É a formação de aglomerados irregulares de células. Pode ocorrer devido à formação de coágulos aquando da recolha do sangue. Pode estar também relacionado com anemia hemolítica autoimune em que os eritrócitos estão revestidos por anticorpos contra eles próprios ⁽⁷⁾.

Quantificação da Hemoglobina

A hemoglobina, constituinte do eritrócito, é responsável pelo transporte do oxigénio para os pulmões e do dióxido de carbono na direcção inversa. É uma proteína tetramérica composta por 4 cadeias ligadas a um grupo heme. Nos eritrócitos de adultos normais a HgA constitui cerca de 97% da hemoglobina total, sendo que existe também HgA2 e HgF ⁽⁵²⁾.

Como foi referido atrás, quando a amostra de sangue chega ao equipamento é adicionado um reagente de lise dos eritrócitos, permitindo assim a libertação da hemoglobina e a sua estabilização, sendo quantificada depois espectrofotometricamente a 525nm. A Hg é expressa em grama por decilitro (g/dL) e os valores de referência variam com o sexo e idade, sendo mais elevados no sexo masculino.

Hematócrito (HCT)

Corresponde à fracção de eritrócitos numa coluna de sangue centrifugada, expresso em percentagem relativamente à coluna total. É calculado pelo equipamento segundo a fórmula: $HTC = \frac{RBC \times MCV}{10}$

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Este parâmetro representa a quantidade média que cada eritrócito possui de hemoglobina. É calculado através da hemoglobina e do número de eritrócitos segundo a seguinte fórmula: $HCM (pg) = \frac{Hg (g/dL) \times 10}{RBC (milhões/\mu L)}$

Valores diminuídos de HCM podem encontrar-se em anemias microcíticas, e valores aumentados em anemias macrocíticas ou em casos de esferocitose.

Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

A CHCM (g/dL) corresponde à razão entre a concentração de Hb e o HCT.

[CHCM= (Hb/HCT) × 100]. Relaciona o número e volume dos eritrócitos com o seu conteúdo. Este parâmetro é útil para avaliar a cromia dos eritrócitos.

Volume Corpuscular Médio (VCM)

Este parâmetro avalia o tamanho dos eritrócitos, podendo estes apresentar tamanho superior ou inferior aos valores de referência, consoante se tratem de eritrócitos macrocíticos ou microcíticos, respectivamente. O VCM é expresso em fentolitros (fL).

Varição do tamanho dos eritrócitos (RDW)

É uma medida de heterogeneidade da população eritrocitária, onde normalmente existe uma variação que pode ir até aos 15%. É expresso em percentagem e quanto maior o RDW, maior a anisocitose ⁽⁷⁾.

Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos não nucleados que conservam ainda restos de RNA, ribossomas e mitocôndrias no seu citoplasma, presentes em grandes quantidades no citoplasma de precursores nucleados de onde derivam.

Os reticulócitos maturam ao fim de 2-3 dias, e passam para a circulação por diapedese, a maioria já como eritrócito. Pode acontecer, em certos casos patológicos, que os reticulócitos entrem em circulação em maior número que o normal, constituindo um índice para avaliar o grau de regeneração dos eritrócitos na medula óssea ⁽⁷⁾.

A contagem de reticulócitos combina a metodologia do Novo Azul de Metileno com a análise de grande precisão da citometria de fluxo utilizando a tecnologia VCS. Assim, fornece uma alta qualidade dos resultados sem a necessidade de utilizar corantes fluorescentes e sistemas de laser dispendiosos.

Uma pequena porção de sangue incuba em câmara aquecida com solução de Novo Azul de Metileno, precipitando o RNA residual que existe nos eritrócitos. Uma porção da amostra corada é transferida para outra câmara juntamente com uma solução de lavagem hipotónica de forma a remover a hemoglobina do eritrócito mas preservando a coloração do RNA dentro da célula. De seguida a amostra é processada atravessando a célula de fluxo

sendo assim analisada da mesma forma que as restantes células, utilizando as três diferentes sondas ⁽⁴⁹⁾.

A percentagem de reticulócitos aumenta na corrente sanguínea em vários tipos de patologias como anemias hemolíticas e sideroblásticas e também no caso de hemorragias crónicas ou agudas. A percentagem de reticulócitos pode diminuir em casos de anemia aplásica, que representa uma disfunção medular ⁽⁵¹⁾.

Plaquetas

As plaquetas são fragmentos de megacariócitos, característicos da medula óssea não sendo usual a sua observação no sangue periférico. Após a migração da medula óssea para o sangue periférico, as plaquetas apresentam um tempo de vida de cerca de 10 dias. A sua principal função prende-se com a situação hemorragia após um trauma tecidual, lesão vascular e reparação do endotélio ⁽⁵⁰⁾. As plaquetas têm grânulos azurófilos que contêm factores de coagulação necessários ao processo de hemostase. Assim, plaquetas agranulares não são funcionais ⁽⁵³⁾.

Uma situação de trombocitose (aumento do número de plaquetas) pode surgir de uma situação reactiva, ou estar relacionada com situação de inflamação crónica, hemorragia, neoplasia ou patologia de plaquetas nomeadamente trombocitémia essencial. A trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas) pode ser devida a neoplasias medulares, infecções virais, alcoolismo crónico, mas também aparece como consequência de tratamentos de quimioterapia e radioterapia ⁽⁵⁴⁾, o que se observa com frequência no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG. Nos casos de trombocitopenia que não são concordantes com o histórico deve-se verificar a possível presença de coágulos e observar esfregaço de sangue periférico para pesquisar a presença de agregados plaquetários.

Agregados Plaquetários – A activação das plaquetas leva à libertação dos grânulos e consequente agregação plaquetar, o que leva a contagens falsamente diminuídas devendo sempre que se suspeita desta situação observar microscopicamente esfregaço de sangue periférico. Certos indivíduos apresentam imunoglobulinas, que após colheita provocam a agregação plaquetar. Nestes casos a colheita deve ser executada a quente, para impedir a acção destas imunoglobulinas a frio.

Satelitismo Plaquetário – Este fenómeno pode ocorrer devido a alterações nas imunoglobulinas de superfície dos neutrófilos provocadas pelo EDTA-K3. É então, uma condição *in vitro*, cuja magnitude se relaciona com o tempo de exposição ao anticoagulante e

que se associa exclusivamente ao EDTA-K3. O satelitismo é induzido por um factor plasmático que leva à adesão plaquetar à superfície dos neutrófilos. Não apresenta significado clínico mas pode originar uma contagem de plaquetas incorrectamente diminuída⁽⁷⁾.

Leucograma

O diferencial leucocitário efectuado no equipamento automático LH 750 da Beckman Coulter, inclui o número absoluto e relativo de neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e células linfoides.

Como já foi referido anteriormente o diferencial leucocitário é gerado através da análise de eventos que passam numa célula de fluxo, utilizando 3 tecnologias distintas. Uma que está relacionada com o tamanho das células ou volume (impedância volumétrica), outra que se relaciona com a complexidade da célula (condutividade que utiliza energia electromagnética) e uma terceira que relaciona o tamanho da célula com a estrutura (dispersão de luz laser).

O resultado destes dados é exposto num gráfico – histograma – a três dimensões (VCS), e os *clusters* são identificados como populações específicas de células, de acordo com o seu tamanho e complexidade⁽⁴⁹⁾.

Nalguns estados patológicos pode ocorrer um aumento do número total de leucócitos (leucocitose) ou uma diminuição (leucopenia). A fórmula leucocitária é pois muito útil para a detecção do leucócito que apresenta variabilidade na contagem. Sempre que existam dúvidas em relação ao diferencial feito pelo equipamento é efectuado esfregaço de sangue periférico e observação microscópica com contagem do diferencial leucocitário e observação das características morfológicas dos leucócitos, recorrendo a um contador manual, obtendo-se assim o resultado da fórmula em termos de percentagem.

Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos que existem em maior número no adulto. Têm um núcleo de cromatina densa e segmentada que se divide em lóbulos (3 a 5) unidos por pontes de cromatina. Uma das suas características é o facto de terem grânulos citoplasmáticos que permitem ao neutrófilo exercer as suas funções, de onde se destaca a função fagocítica durante o processo de inflamação⁽⁵⁵⁾.

Uma diminuição do número de neutrófilos (neutropenia) pode ser devida ao uso de drogas, leucemia, anemia aplásica e a síndromes mielodisplásicas. Já um aumento (neutrofilia)

pode ter como causa doenças infecciosas e inflamatórias, stress, tabagismo, infecções bacterianas e patologias da série mieloide ⁽⁵²⁾.

Basófilos

São as células menos numerosas no sangue periférico normal, representando apenas 1% do total dos leucócitos. O núcleo tem normalmente 2 lóbulos cobertos pelas abundantes granulações que caracterizam os basófilos ^(7; 55).

Um aumento de basófilos pode ser um sinal precoce de doença mieloproliferativa. Está também relacionado com leucemias de basófilos e reacções de hipersensibilidade. Da sua função faz parte a libertação de histamina no local da inflamação, originando vasodilatação, o que facilita a migração dos restantes leucócitos. Nos tecidos diferenciam-se em mastócitos que se ligam às IgE, quando os alérgenos se ligam a este complexo ocorre desgranulação dos mastócitos conduzindo a reacções de hipersensibilidade imediata ⁽⁵²⁾.

Eosinófilos

O eosinófilo tem um núcleo bi ou trilobulado com cromatina densa e sem nucléolos. O citoplasma apresenta grânulos que após coloração pelo método de Wright adquirem cor alaranjada e assim são facilmente identificados por microscopia óptica. Os eosinófilos participam dos mecanismos de defesa contra corpos estranhos e parasitas. A maior parte dos eosinófilos está presente nos tecidos, aparecendo em pouca quantidade no sangue periférico ^(7; 55). As causas mais comuns de eosinofilia são infecções parasitárias e reacções alérgicas ⁽⁵²⁾.

Monócitos

É a maior célula madura do sangue periférico. Apresenta um núcleo irregular, citoplasma cinza com grânulos azurófilos finos. O seu destino é os tecidos onde se vão diferenciar em vários tipos de macrófagos. As principais funções do monócito e do macrófago são: a defesa contra microrganismos e células tumorais; remoção de células velhas e danificadas bem como de proteínas plasmáticas; participação no metabolismo do ferro e processamento de antígenos para apresentar aos linfócitos ^(7; 55).

O aumento do número de monócitos (monocitose) pode ser devido a várias patologias ou estados clínicos como infecções, doenças granulomatosas ou distúrbios

mieloproliferativos. A monocitopenia pode ocorrer devido a anemia aplásica, algumas leucemias ou administração de glucocorticoides ⁽⁵²⁾.

Linfócitos

Os linfócitos são células mononucleares, com um núcleo regular e um citoplasma sem grânulos específicos ⁽⁷⁾. Existem duas populações de linfócitos: B e T. Actuam no sistema imunitário na resposta às invasões por agentes estranhos. Os linfócitos T completam a sua maturação no timo, onde adquirem a capacidade de reconhecer os diferentes antigénios e controlar a produção de anticorpos. Ao reconhecer um antigénio, os linfócitos T estimulam os linfócitos B a produzir anticorpos específicos para aquele antigénio ⁽⁵⁶⁾.

Velocidade de Sedimentação

A VS é considerada um teste não específico. No entanto, é um importante indicador indirecto da resposta inflamatória aguda, aumentando na presença de infecções e processos inflamatórios crónicos e agudos ⁽⁵⁷⁾. Neste laboratório, é usado um método automatizado para medição da velocidade de sedimentação: Alifax Test I BCL (Fig. 22).



Figura 22 Alifax Test I BCL

Este equipamento automático analisa a velocidade de sedimentação globular dos eritrócitos, no tubo primário de K3-EDTA. Este parâmetro é a velocidade em mm/h, a que sedimentam os eritrócitos no plasma, e depende da sua maior ou menor capacidade para a agregação, que por sua vez depende da presença de certas proteínas que neutralizam as cargas negativas dos eritrócitos e o efeito de repulsão entre si. Esta técnica realiza-se por fotometria cinética. Mede então a velocidade de formação dos agregados de eritrócitos e o seu tamanho na fase de agregação, nesta fase inicial realizam-se medições da densidade óptica da amostra num sistema capilar. Um algoritmo matemático transforma a leitura da densidade óptica da fase de agregação em mm/hora.

O controlo de qualidade é feito diariamente, bem como a limpeza do equipamento. Apenas após estes procedimentos estarem concluídos se inicia o processamento das amostras. O controlo de qualidade interno, baseia-se no processamento de três amostras com valores conhecidos de turvação, submetidas ao mesmo procedimento de valorização das amostras, cujos resultados se devem ajustar a intervalos esperados, de modo que se verifique a calibração do equipamento. O kit de controlo tem três níveis.

Na figura abaixo (Fig. 23) encontra-se um exemplo de um resultado de hemograma e VS executado no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E.

Descrição	Resultado	Unidade	Valor de Referência
HEMOGRAMA			
LEUCOCITOS	7.2	G/L	4.0 - 11.0
Neutrófilos seg	58.8	%	45 - 70
Linfócitos	31.3	%	20 - 40
Monócitos	6.6	%	3 - 10
Eosinófilos	3.10	%	1 - 5
Basófilos	0.20	%	0 - 2
ERITROCITOS	4.7	T/L	4.0 - 5.5
HEMOGLOBINA	14.6	g/dl	12 - 16
HEMATOCRITO	43	%	35 - 47
VCM	91.2	fl	85 - 95
HCM	31.4	pg	27 - 32
CHCM	34.5	g/dl	32 - 36
RDW	13	%	11.5 - 14.5
PLAQUETAS	174	G/l	150 - 450
VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO			
VS (1 Hora)	12	mm/h	0 - 20

Figura 23 – Exemplo de Hemograma e VS executado no sector de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do IPO

Tomando esta figura como exemplo é possível observar-se que o hemograma engloba os diferentes tipos de leucócitos, os glóbulos vermelhos e todos os parâmetros com eles relacionados bem como as plaquetas. Estes encontram-se dentro dos valores de referência. É um exemplo de uma situação não patológica. O mesmo acontece para a VS.

Hemostase

No Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E. o equipamento utilizado para as provas de coagulação é o ACL TOP 500, Instrumentation Laboratory (Fig. 23).



Figura 24 ACL TOP 500, Instrumentation Laboratory

Este equipamento apresenta um menu completo de ensaios para a monitorização, avaliação e diagnóstico de riscos trombóticos e de hemorragia. É um sistema de carga contínua com leitor de códigos de barras com um tempo de resposta bastante rápido. A sua tecnologia permite minimizar interferências de amostras lipémicas e ictéricas e está integrado no laboratório através de uma rede que transmite os resultados para os computadores centrais do sector onde se procede à validação biopatológica.

A hemostase pode ser definida como o processo pelo qual o sangue se mantém sob a forma líquida dentro do sistema vascular. É um mecanismo de defesa do organismo contra qualquer forma de hemorragia, que culmina com a formação fisiológica do coágulo da fibrina. É regulada por factores extravasculares que envolvem os tecidos localizados na periferia dos vasos e que estão ligados à estrutura vascular lesada, onde ocorre um processo de vasoconstrição reflexa e formação de um coágulo primário; e intravasculares onde participam factores plaquetares, proteínas plasmáticas, fosfolípidos e iões cálcio que estão envolvidos na coagulação sanguínea.

Coagulação Sanguínea

O processo de coagulação envolve as plaquetas e os factores de coagulação, os quais após a lesão são activados sequencialmente dando origem àquilo a que se designa de “cascata de coagulação”. Os inibidores da coagulação, por sua vez, constituem um sistema de controlo ligando o excesso de factores em circulação prevenindo a formação de trombos.

A reacção central do mecanismo da coagulação consiste na conversão da Protrombina em Trombina (PT). O estudo da coagulação plasmática *in vitro* permitiu definir

os mecanismos da via extrínseca e da via intrínseca, ambos implicados na formação de trombina, responsável pela conversão do fibrinogénio em fibrina.

A cascata da coagulação pode ser dividida em duas vias: A via intrínseca, em que os factores necessários a que a coagulação ocorra estão presentes no sangue, sendo necessária a sua activação, e a via extrínseca onde substâncias (Factor tecidual (FT), libertado pelos tecidos danificados) normalmente ausentes no sangue são necessárias para desencadear o início da cascata. Estas duas vias convergem numa via comum a partir da activação do factor X.

Na via extrínseca, o factor VII plasmático (na presença do seu cofactor, o FT ou tromboplastina) activa directamente o factor X. Na via intrínseca, a activação do factor XII ocorre quando o sangue entra em contacto com uma superfície, contendo cargas eléctricas negativas (por exemplo, a parede de um tubo de vidro). Tal processo é denominado “activação por contacto” e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogénio de alto peso molecular (um cofactor não enzimático). O factor XIIa activa o fator XI, que, por sua vez, activa o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIII, activa o fator X da coagulação, desencadeando a formação de trombina e subsequente formação de fibrina ⁽⁵⁸⁾. Esta explicação está esquematizada na figura 25.

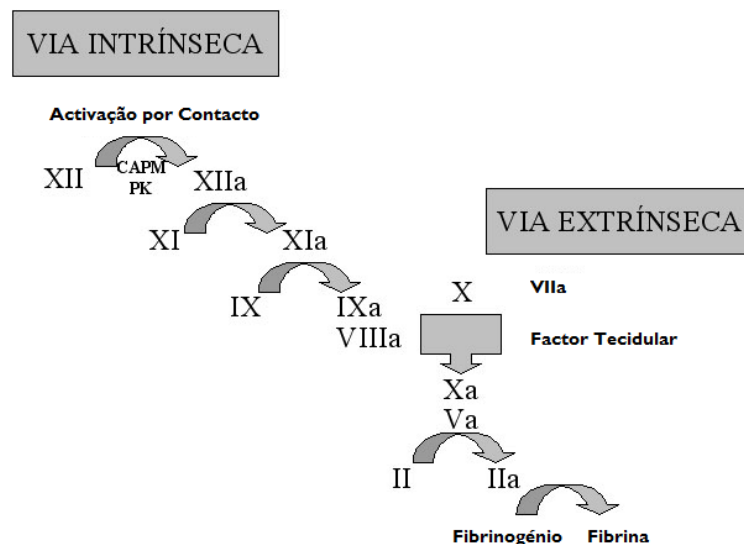


Figura 25 Esquema representativo do modelo da cascata da coagulação

Estudos Coagulativos

São estudos realizados sobre plasma pobre em plaquetas.

Após colheita de sangue para tubo com citrato de Na^+ , este deve ser agitado convenientemente por forma a prevenir a activação da cascata da coagulação com consequente consumo de factores, o que poderia falsear os resultados obtidos. As amostras são então centrifugadas 10 minutos a 3000 rpm, por forma a obter plasma pobre em plaquetas, com o qual se irão executar os diferentes testes. Este plasma contém todos os factores de coagulação necessários à formação da rede de fibrina, excepto o Ca^{2+} .

O estudo da coagulação tem utilidade prática no diagnóstico de síndromes hemorrágicas apesar de não ser totalmente fiel à coagulação fisiológica. No entanto, provas como o PT e o tempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) permitem detectar a maior parte das síndromes hemorrágicas devidas a defeitos na coagulação. Apenas o factor XIII não é explorado por estas duas provas ^(58; 59).

Tempo de protrombina

A determinação do PT permite avaliar alterações da via extrínseca da coagulação além de ser útil na monitorização de doentes com terapêutica anticoagulante, nomeadamente anticoagulantes orais (varfin).

Este teste mede o tempo que uma amostra de plasma pobre em plaquetas e anticoagulada com citrato de Na^+ , demora a formar a rede de fibrina, colocando a amostra em contacto com uma suspensão de tromboplastina tecidular e fosfolípidos exógenos, sendo o processo iniciado pela adição de Ca^{2+} . O tempo que o plasma demora a formar um coágulo de fibrina define o tempo de protrombina.

Assim sendo, com este método é possível avaliar funcionalmente, e como um todo os factores II, V, VII, X e fibrinogénio. O TP apresentar-se-á prolongado na deficiência de qualquer um destes factores, bem como na presença de inibidores, como seja o varfin farmacológico. O TP é adequado para:

- Controlo da terapia anticoagulante oral;
- Diagnóstico de deficiências congénitas e adquiridas de factores de coagulação;
- Controlo da actividade de síntese hepática, pois estes factores são produzidos nos hepatócitos.

Os valores de referência para o PT variam de laboratório para laboratório pois estão dependentes dos reagentes, dos lotes dos mesmos e do método de leitura.

Os resultados são expressos em segundos, percentagem e ainda como I.N.R. (Internacional Normalized Ratio), que compara o reagente utilizado em cada laboratório com um internacional possibilitando assim a comparação de resultados de diferentes laboratórios ⁽⁶⁰⁾. O valor de INR deve aproximar-se de 1 em situações normais pois a fórmula que permite calcular o I.N.R é a seguinte $INR = \left(\frac{TP\ teste}{TP\ pool\ normal} \right)^{ISI}$, sendo o ISI o “Index de Sensibilidade Internacional”, que varia de reagente para reagente e de lote para lote, estando indicado em cada bula de reagente. O INR terapêutico deve variar entre 2 e 3, sendo sempre estabelecido pelo clínico. Para valores de INR elevados os pacientes incorrem risco de hemorragia, assim como valores de INR abaixo do estabelecido pelo clínico pode aumentar o risco de AVC.

Tempo de Tromboplastina Parcial activada

O aPTT, também chamado de Tempo de Cefalina Caulino, é um processo de *screening* na avaliação das alterações da via intrínseca da coagulação e monitorização de doentes com terapêutica anticoagulante, nomeadamente anticoagulante endovenoso (heparina).

Esta determinação consiste em adicionar ao plasma citratado activadores de contacto, fosfolípidos e iões cálcio em excesso promovendo o início da cascata de coagulação e culminando com a formação do coágulo de fibrina. O tempo que o plasma demorar a formar o coágulo de fibrina será o tempo de activação parcial da tromboplastina.

O aPTT encontra-se prolongado na presença de deficiências nos factores da via intrínseca (XII, XI, IX e VIII). É também sensível, se bem que em menor grau, ao défice de factores da via comum (X, V, II e fibrinogénio).

O aPTT encontra-se alargado quando existem fármacos com actividade inibitória do factor IIa, de tal forma que é o teste de eleição para o controlo do tratamento com estes fármacos. Encontra-se também alargado na presença de anticorpos antifosfolipídicos, nomeadamente anticoagulante lúpico. Assim um aPTT alargado associa-se a um aumento do risco hemorrágico (hemofilias por défice de factores VIII, IX, e XI) e a um aumento do risco trombótico (anticoagulante lúpico) ^(58; 60).

Tempo de Trombina

Mede o tempo em segundos que demora a conversão do fibrinogénio solúvel em fibrina. Tempos de trombina prolongados ocorrem quando o nível de fibrinogénio se encontra abaixo dos 75-100mg/dL ou quando estamos em presença de fibrinogénio não funcional. É um estudo extremamente sensível à presença de heparina ou produtos de degradação de fibrina, onde se prolonga marcadamente.

Fibrinogénio

O fibrinogénio (ou factor I) sintetizado no fígado, para além de apresentar actividade essencial à formação do coágulo, é também uma proteína de fase aguda que se encontra aumentada em situações de inflamação, infecções agudas e neoplásicas.

Níveis baixos de fibrinogénio podem encontrar-se em desordens hereditárias tais como hipofibrinogenemia, afibrinogenemia, disfibrinogenemia e também em outras formas como doenças hepáticas, coagulação intravascular disseminada, síndromes fibrinolíticas, etc.

O doseamento do fibrinogénio no equipamento automático ACL TOP 500 , é primeiramente efectuado por avaliação da taxa de aumento da turbidez obtida com o PT da amostra. Esta é directamente relacionável com a concentração de fibrinogénio no plasma.

Sempre que os valores se encontram fora do intervalo de referência, as amostras são automaticamente processadas com recurso ao método de referência - método de Clauss. No método de Clauss, quando um excesso de trombina é adicionado a plasma, o tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio plasmático. O tempo de coagulação obtido é comparado posteriormente com uma preparação de fibrinogénio padronizada.

Os valores de referência para este método apresentam, para um indivíduo normal, uma concentração de fibrinogénio entre 150-400 mg/dl.

D-dímeros

Do processo de fibrinólise resultam produtos de degradação da fibrina, sendo o dímero-D um fragmento específico da rede de fibrina que circula na corrente sanguínea durante alguns dias, após um acidente trombótico. Os D-dímeros são um marcador de grande valor para excluir o diagnóstico de trombose venosa profunda e embolia pulmonar.

Patologias mais comuns associadas à coagulação

Hemofilia A

Na hemofilia A existe uma deficiente produção de factor VIII, a nível hepático comprometendo-se a normal formação do coágulo de fibrina. Os pacientes portadores de Hemofilia A apresentam habitualmente alargamento do aPTT. Nestas situações a análise à actividade do factor VIII é essencial para o diagnóstico de Hemofilia A.

Hemofilia B

Como a hemofilia A, a B é também devida à deficiência de um factor de coagulação, neste caso o factor IX. Clinicamente é indistinguível da hemofilia A e o seu tratamento passa pela administração sistémica de factor IX.

Os hemofílicos requerem atenção especial em alguns procedimentos a fim de evitar hemorragias severas. Certos medicamentos como a aspirina ou outros anti-inflamatórios com acção antiplaquetária são contraindicados.

Doença de Von Willebrand

A causa mais comum da disfunção plaquetária hereditária é a Doença de Von Willebrand. É uma coagulopatia congénita que se manifesta por uma adesão das plaquetas deficiente e uma deficiência no factor VIII que leva a um alargamento do aPTT. O estudo do FVW (factor de von Willebrand) é essencial na distinção entre a Doença de Von Willebrand e a Hemofilia A ⁽⁶¹⁾.

Deficiência de vitamina K

Os factores VII, IX, X, II e a proteína S e C dependem da vitamina K para a sua síntese. A deficiência em vitamina K leva à diminuição destes factores e consequente aumento do PT e aPTT, incorrendo-se risco hemorrágico. A administração de vitamina K é necessária para corrigir este tipo de desordens ⁽⁶²⁾.

Conclusões

Foi muito vantajoso para mim realizar o estágio no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG E.P.E. Adquiri conhecimentos não só de cariz prático mas também teórico que me ajudaram a complementar os conhecimentos adquiridos durante a fase curricular do Mestrado de Análises Clínicas.

Estar em contacto directo com um serviço deste nível permitiu-me ter a noção de como se trabalha sempre primando pela qualidade, apesar das condicionantes, principalmente económicas a que o serviço está sujeito. Mesmo assim, em praticamente todos os sectores existem dois equipamentos com a mesma função. Normalmente são alternados diariamente, para que se tenha a certeza que estão a funcionar de maneira correcta, assim quando por algum motivo existe uma avaria ou a necessidade de parar um equipamento o serviço continua a trabalhar com a certeza de estar a dar resultados fiáveis.

Durante o meu estágio no serviço de patologia clínica vários equipamentos foram testados, pois o serviço prima por excelência na qualidade dos resultados e por isso encontram-se habitualmente equipamentos à experiência de maneira a avaliar a relação qualidade/custo e tentar minimizar os tempos de espera.

Este estágio sensibilizou-me principalmente para a responsabilidade que o TSAC tem em assegurar a qualidade de todo o processo analítico até à validação biopatológica, tendo sempre um espírito crítico.

Bibliografia

1. Vivek Bhat, Manikchandra Tiwari, et al. Analysis of laboratory sample rejections in the pre-analytical stage at an oncology center. *Clinica Chimica Acta*, 2012;413: 1203–1206
2. Goswami B, Singh B, et al. Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience. *Clin Chem Lab Med*, 2010;48(1):63–6
3. Ashakiran S., M.E. Sumati, et al. A study of pre-analytical variables in clinical biochemistry laboratory. *Clinical Biochemistry*, 2011;44: 944-945
4. Giorgio Da Rin. Pre-analytical workstations: A tool for reducing laboratory errors. *Clinica Chimica Acta*, 2009;404: 68–74
5. Mario Plebani. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*, 2009; 404: 16-23
6. Xiaofei Lai, M.D., Ping Yang, M.D., et al. Analysis of Factors Influencing the Generation of Unqualified Clinical Samples and Measures to Prevent this Generation. *Annals of Laboratory Medicine*, 2012; 32:216-219
7. Bain, Barbara J., *Blood Cells*, 4th, London, Artmed, 2007
8. Caleffi, A., Manoni F., et al, Quality in extra-analytical phases of urianalysis, *Biochimica Medica*, 2010; 20: 179-183
9. Kindt T., Osborne B., Goldsby R., *Kuby Immunology*, 6th edition, W.H. Freeman & Company, 2006; 147, 148
10. Roche Diagnostics Corporation: Cobas e411 analyser; 2011; 1-4
11. Sennikov S., Krysov S., et al., Quantitative analysis of human immunoregulatory cytokines by electrochemiluminescence method, *Journal of Immunological Methods*; 2003; 275: 81– 88
12. Wei H., Wang E., Electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium and its applications in bioanalysis: a review; *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*; 2011; 26: 77–85
13. Chen W., ZONG J., *Chemiluminescent Immunoassay and Its Applications*; *Chin J Anal Chem*; 2012, 40: 3–10

14. Colombier A., Duflo-Leroy A., et al., Analytical evaluation of assays in vitamine B12 and folates on Immulite 2000 Analyzer; *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*; 2002; 1:40–47
15. Moutereau S., , Rymer JC., *Kryptor - Evaluation finale en situation de routine; Immunoanal Biol Spéc*; 1998; 13: 307-316
16. Kryptor: Instructions for Use – CA 125; B·R·A·H·M·S ; Version R26; 2011; 1-6
17. Bogard C., Bouizegarène T., et al., Evaluation de L'analyseur multiparamétrique Konelab 60i; *Revue Française de Laboratoires*; 1999; 312: 157-163
18. Molina R., Filella X., Marcadores tumorales. Estado actual y perspectivas de futuro II. Hospital Clinico de Barcelona. Roche Diagnostics S.I. 2003
19. Duffy M. J., Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *European Journal of Internal Medicine* 2007; 18: 175–184
20. Daniel L., Clarke-Pearson, M.D., Screening for Ovarian Cancer. *The new england journal of medicine*. 2009;361:170-7
21. Michael J. D., Evoy D., CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411: 1869–1874
22. Ventrucci M., Pozzato P., Persistent elevation of serum CA 19-9 with no evidence of malignant disease. *Digestive and Liver Disease*. 2009; 411: 357–363
23. Hidalgo M., Pancreatic Cancer. *The new england journal of medicine* 2010; 362:1605-17.
24. Gadducci A., Cosio S., et al., Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2004. 58: 24–38
25. Patel J.L., Erickson J.A., Performance characteristics of an automated assay for the quantitation of CYFRA 21-1 in human sérum. *Clinical Biochemistry*. 2010; 43: 1449–1452
26. Holdenrieder S., Pawel J., Nucleosomes, ProGPR, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in Monitoring First-Line Chemotherapy of Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14:7813-7821

27. Caquet, R., Guia Prático das Análises Clínicas, 2ª Edição, Lisboa, Climepsi Editores, 2004
28. Palumbo A., Anderson K., Multiple Myeloma, *The new england journal of medicine*, 2011; 364: 1046-60
29. Korse C., Taal B., et al., Choice of tumour markers in patients with neuroendocrine tumours is dependent on the histological grade. A marker study of Chromogranin A, Neuron specific enolase, Progastrin-releasing peptide and cytokeratin fragments, *European Journal of Cancer*, 2012; 48: 662 – 671
30. Grilo M., Oliveira M., Papel do antigénio específico da próstata no rastreio do carcinoma da próstata, *Acta Urológica* 2004; 21; 2: 27-33
31. Elise R., Routine serum calcitonin measurement in the evaluation of thyroid nodules, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008; 6: 941–953
32. Bossuyt X., Bogaerts A., Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clinical Chemistry* 1998; 44: 944–949
33. Silva R., Lopes A., et al., Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation, *Revista Médica de Minas Gerais*. 2008; 18: 116-122
34. Silva D., Teodoro G., Electrophoretic profile of plasmatic proteins: study in children assisted at the Pediatric Hospital – Hosped/ufrrn in natal city, *RBAC*; 2005; 37: 239-242
35. Wicher J.T., Spence C.E. Serum protein electrophoresis - An out moded test. *Ann. Clin. Biochem.*, 1987, 24, p. 133 à 139
36. Fanali G., Masi A., Human serum albumin: From bench to bedside, *Molecular Aspects of Medicine*; 2012; 33: 209–290
37. Snyder M., and Fantz C.R., Cirrhosis Originally Diagnosed as Nonalcoholic Steatohepatitis, *Clinical Chemistry*; 2008; 54: 1395–1399
38. Carrer D., Electrophoresis immunofixation of serum protein, illustrated interpretations. 2nd ed. Laboratoires Sebia 1994;13-99
39. Kyle R. A., S. Rajkumar V., Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Best Practice & Research Clinical Haematology*; 2005; 18: 689–707

40. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57
41. Alexanian R, Weber D, Liu F. Differential Diagnosis of Monoclonal Gammopathies. *Arch Pathol Lab Med*; 1999;123(2):108-13
42. Tamimi W., Alaskar A., et al., Monoclonal gammopathy in a tertiary referral hospital. *Clinical Biochemistry*; 2010; 43: 709–713
43. Kyle A., Therneau T., Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance; *The new England Journal of Medicine*; 2006; 354:1362-9
44. Keren D. F., "High Resolution Electrophoresis and Immunofixation Techniques and Interpretation", Butterworth-Heinemann, Woburn, Ma, USA, 2nd ed., 1994, 397 pp
45. Peixoto D., Dingli D., Modelling hematopoiesis in health and disease, *Mathematical and Computer Modelling*, 2011; 53: 1546–1557
46. Kaushansky K., Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors, *The New England Journal of Medicine*, 2006, 354: 2034 – 2045
47. Buttarello M., Quality specification in haematology: the automated blood cell count, *Clinica Chimica Acta*, 2004; 346: 45 – 54
48. Bacall N., Automated hematology analyzer and the importance of validation of new equipment in the clinical laboratory, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 2009;3: 218-220
49. COULTER® GEN•S™ Clinical Case Studies; Beckman Coulter; USA; 2000
50. Aulesa C., Pastor I., Validation of the Coulter LH 750 in a Hospital Reference Laboratory, 2002, *Laboratory Hematology* 9:15-28
51. Bain B., et al., Diagnosis from the Blood Smear, *The New England Journal of Medicine*, 2005; 353: 498-507
52. Lichtman M., Kipps T., et al., *Williams Hematology*, 8th Edition, McGraw-Hill Professional, 2010
53. Davì G., et al., Platelet Activation and Atherothrombosis, *The New England Journal of Medicine*, 2007; 357: 2482-94

54. Sulai N., Tefferi A., Why Does My Patient Have Thrombocytosis?, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2012; 26: 285–301
55. Greer J., Foerster J., et al., *Wintrobe's Clinical Hematology*, Vol 2, Twelfth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008; 1896
56. Bishop G., Hostage B., B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes, *Current Opinion in Immunology*, 2001; 13: 278–285
57. Calderon A., Wener M., Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein, *Hospital Medicine Clinics*, Volume 1, 2012; 3: 313-337
58. Santasusana P., *Bases fisiológicas y estudio de la hemostasia y la thrombosis*. Barcelona. 9-86
59. Franco R., Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis, *Hemostasia e trombose*, 2001; 34: 229-237
60. Valerie N., Prothrombin Time and Partial Thromboplastin Time Assay considerations, *Hemostasis and Coagulation*, 2009, 2: 253–263
61. Peyvandl F., Klamroth R., Management of bleeding disorders in adults, *Haemophilia*, 2012; 18: 24–36
62. Napolitano M., Mariani G., et al, Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2010; 5:21