

• U



C •

FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Paula Cristina Borges Pinheiro Sobreira

Coimbra, 2012

Paula Cristina Borges Pinheiro Sobreira

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Análises Clínicas, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob orientação da Dra Filomena Maria de Fátima da Silva de Cabêdo e Lencastre, Diretora Técnica do Laboratório Virgílio Morais Roldão.

De setembro de 2011 até junho de 2012

(Áreas de Hematologia e Imunologia)

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho".

Dalai Lama

Agradecimentos

A dissertação de Mestrado aqui apresentada, só foi possível com muita “*determinação, coragem e autoconfiança*”.

Agradeço a toda a minha família, pelo apoio e carinho, em especial, ao meu marido e filhas Rita e Daniela, pela paciência e compreensão ao longo destes dois anos.

À Professora Doutora Leonor Martins Almeida, coordenadora deste curso, pela sua disponibilidade e dedicação.

A todos os colaboradores do Laboratório Virgílio Roldão, pelo bom ambiente de trabalho e a compreensão da minha ausência, encarada de uma forma afetuosa.

Agradeço à Dra Ana, colega e amiga, pelo seu contributo na implementação do novo acordo ortográfico neste relatório.

Por último, presto um especial agradecimento à Dra. Filomena Lencastre, orientadora do estágio no laboratório, pelo aconselhamento na revisão do relatório, sendo o seu contributo fundamental para a concretização deste meu Mestrado.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas | V |
| Resumo | VI |
| Introdução | I |
| Capítulo I - Hematologia geral | 3 |
| 1. Velocidade de sedimentação globular | 3 |
| 2. Reticulócito | 4 |
| 3. Coloração de May-Grünwald-Giemsa | 4 |
| 4. Hemograma..... | 4 |
| a. Princípio do funcionamento do aparelho automático | 4 |
| b. Índices eritrocíticos | 7 |
| c. Interpretação do hemograma | 7 |
| d. Diagnóstico diferencial de anemia..... | 10 |
| e. Resumo do diagnóstico diferencial de anemia..... | 12 |
| f. Algoritmo de validação do hemograma | 13 |
| 5. Hemostase..... | 13 |
| a. Avaliação laboratorial dos principais testes..... | 14 |
| b. Interpretação de resultados..... | 19 |
| Capítulo 2 - Imuno-hematologia | 20 |
| 1. Coombs direto e indireto..... | 20 |
| a. Coombs indireto | 20 |
| b. Coombs direto | 21 |
| 2. Grupos sanguíneos | 21 |
| Capítulo 3 - Imunologia | 23 |
| 1. Princípio dos imunoenaios | 23 |
| a. Imunoensaio de precipitação | 23 |
| b. Imunocromatografia | 23 |
| c. Imunoensaio enzimático..... | 24 |
| 2. Imunoenaios | 27 |
| a. Marcadores tumorais..... | 27 |
| b. Marcadores hormonais | 29 |
| c. Marcadores de infecciosa | 34 |
| d. Marcadores de anemia..... | 40 |

| | |
|--|-----------|
| e. Marcadores de alergia | 42 |
| 3. Técnicas manuais | 43 |
| a. Rapid Plasma Reagin..... | 43 |
| b. Paul-Bunnel..... | 43 |
| c. Antígenios febrís | 44 |
| d. Waaler-Rose | 45 |
| e. Anticorpos antinucleares..... | 46 |
| Capítulo 4 - Sistema de Gestão da Qualidade | 47 |
| 1. Organização diária no laboratório..... | 47 |
| a. Gestão e análise do produto biológico | 48 |
| b. Gestão das atividades de apoio..... | 49 |
| 2. Processo de gestão da qualidade..... | 50 |
| 3. Condicionantes no laboratório | 50 |
| Conclusão | 52 |
| Referências bibliográficas..... | 53 |

Abreviaturas

AINE – anti-inflamatório não esteroide

CID – coagulação intravascular disseminada

EBV – Epstein-Barr vírus

EPO – eritropoietina

ET – trombocitemia essencial

HSV – Herpes Simplex Vírus

LLC – leucemia linfoblástica crónica

LMC – leucemia mieloide crónica

LMMC – leucemia mielomonocítica crónica

MO – medula óssea

PTI – púrpura trombocitopénica idiopática

WIC – contagem dos glóbulos brancos por impedância

WOC – contagem dos glóbulos brancos por ótica

HAC – hiperplasia adrenal congénita

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão

Trab – anticorpos antirreceptores de TSH

Resumo

O presente relatório descreve todas as atividades nas quais estive envolvida, no âmbito da realização do estágio curricular do curso de Mestrado de Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

As áreas de Hematologia e de Imunologia, aqui abordadas, foram descritas de forma sintética, embora suficientemente explícita, tendo o cuidado em manter uma certa coerência entre os temas desenvolvidos. De igual modo, foi realizada a respetiva interpretação dos dados laboratoriais.

Para além da abordagem às técnicas por mim desempenhadas, foram também descritas a organização diária e o sistema de gestão de qualidade implementados no laboratório, bem como as condicionantes de natureza económica, ambiental, de recursos humanos e de segurança que caracterizam o exercício da profissão.

Abstract

The present report describes all the activities in which I was involved in the context of the realization of the curricular period of the Master's degree of Clinical Analyses, of the Pharmacy College of the University of Coimbra.

The areas of Hematology and Immunology, discussed here, were described in summary form, although sufficiently explicit, taking care to maintain a certain coherence between the developed subjects. Similarly, the respective interpretation of laboratory data was carried out.

In addition to the techniques performed by me, they were also described, the daily organization and the quality management system implemented in the laboratory, as well as the constraints of economic, environmental, human resources and security that characterize the profession.

Introdução

O estágio decorreu no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) Virgílio M. Roldão, com sede na Marinha Grande, laboratório no qual exerço atividade profissional de técnica superior, desde o ano 2000.

A sua concretização veio sedimentar os conceitos teóricos adquiridos ao longo da formação curricular, melhorando a compreensão do funcionamento dos equipamentos automáticos utilizados nas diferentes áreas laboratoriais, assim como os mecanismos subjacentes aos ensaios aplicados no laboratório. Permitiu-me, pois, um enriquecimento profissional, que se traduz no dia a dia, por uma visão mais crítica e holística do trabalho exercido.

A equipa de colaboradores é constituída por 8 elementos: uma Diretora Técnica (DT), especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, um gestor da Qualidade (GQ), duas Técnicas Superiores de laboratório (TS), duas Técnicas de Análises Clínicas (TAC) e duas administrativas. O laboratório está licenciado para executar as valências de **Hematologia, Bioquímica, Imunologia/Endocrinologia, Microbiologia e Toxicologia.**

Foi estabelecido, pela Diretora Técnica, um sistema de trabalho rotativo anual, que permite às Técnicas Superiores exercerem funções em todas as áreas do laboratório, de modo a manterem-se atualizadas ao longo do tempo. Por tal razão, no decurso do estágio, tive a oportunidade de permanecer na secção de Hematologia e de Imunologia/Endocrinologia, tendo sido estas as áreas escolhidas para aprofundamento neste relatório.

Em primeiro lugar, um pouco de história...

O laboratório Virgílio M. Roldão foi fundado em 1959 pelo Dr. Virgílio Moraes Roldão. Em 1988, a gerência e a direção técnica foram assumidas pela Dra. Filomena Maria de Fátima da Silva de Cabêdo e Lencastre, licenciada em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia de Lisboa, especialista em Análise Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos.

O LAC é duplamente certificado desde 2006, pela APCER, cumprindo os requisitos de acordo com as Normas NP EN ISO 9001/2008 e Normas para o Laboratório Clínico Edição nº2 de maio de 2003 da Ordem dos Farmacêuticos. Num contexto empresarial, o

laboratório encontra-se integrado na Associação Complementar de Empresas-Labomi (ACE-Labomi) do qual fazem parte 35 laboratórios, espalhados por todo o país (ver em <http://www.acelabomi.co.pt/php/primeira.php?lingua=1&pagina=1001>).

Atualmente, o laboratório encontra-se apetrechado com modernos equipamentos automatizados e dispõem de excelentes programas informáticos, que se tem revelado preciosas ferramentas de trabalho, indispensáveis para um desempenho com qualidade acima da média. O programa informático de suporte, denominado **Apollo versão 2.0**, é um grande aliado no processo analítico, desde a entrada de um pedido de análises no sistema até à saída dos resultados. Outros programas tais como o **Multi QC**, para a gestão dos controlos internos e externos, o **Infoqual 2005**, para a gestão do sistema da qualidade, o **Express Thermo**, para o controlo dos equipamentos sujeitos a medição e monitorização (EMM) e o **Gestock**, para a gestão dos materiais de laboratório, trouxeram eficácia e eficiência, efetuando-se assim, um trabalho diário de excelência no laboratório.

Tendo em conta que, o equipamento a ser adquirido pelo laboratório deve ser compatível com as suas necessidades e possibilidades, dependendo em parte do fluxo de doentes/amostras, os equipamentos escolhidos pela Gestora encontram-se enumerados na tabela I.

Tabela I: lista de equipamentos automatizados do LAC Virgílio M. Roldão

| Área | Equipamento (s) / Casa Comercial | Técnica (s) usada (s) | Fluxo de doentes / amostras por ano |
|-------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| Bioquímica | -COBAS 6000, modulo c501 / Roche Diagnostics | -turbidimetria -espectrofotometria | 106.509 |
| | -Microtech 648 PC / Baptista Marques diagnostics | -eletroforese em suporte celulose | |
| | -ADAMS A1c HA-8160 / A.Menarini diagnostics | -HPLC | |
| | -Super Aution 4250 / A.Menarini diagnostics | -reflexão bicromático -índice de refração | |
| Hematologia | -Cell-Dyn 3500 / Abbott diagnostics | -citometria de fluxo -impedância elétrica | 16.511 |
| | -Start 4/ Roche Diagnostics | -coagulometria | |
| Imunologia/ endocrinologia | -VIDAS/ Biomérieux | -ELFA | 15.864 |
| | -COBAS 6000, modulo e601 / Roche Diagnostics | -eletroquimioluminiscência | |
| Microbiologia | - Vitek 2 Compact 15 / Biomérieux | - sistema ótico de transmissão (atividade e crescimento) | 3.484 |

Capítulo I - Hematologia geral

A hematologia geral é uma das áreas do laboratório, que estuda os elementos do sangue periférico, os seus precursores, bem como o processo de coagulação. As análises mais requisitadas pelo clínico, como principal exame de triagem da condição de saúde do indivíduo, pertencem a esta área, tais como o hemograma completo e a velocidade de sedimentação globular.

I. Velocidade de sedimentação globular (VSG)

A VSG é um exame de rotina que, tanto reflete o estado geral de saúde como avalia um possível processo inflamatório e/ou infeccioso, ou serve de bom prognóstico à terapêutica. Contudo, é pouco sensível e específico, não ajudando o clínico na elaboração do seu diagnóstico.

Para a determinação de VSG, o método de referência é a de Westergren. O sangue, colhido para um tubo de citrato de sódio, é aspirado para uma pipeta retilínea e graduada, que é colocada verticalmente sobre uma estante. A leitura é dada pela altura da coluna de plasma, no limite de separação com as hemácias sedimentadas, ao fim de uma e duas horas, sendo o resultado expresso em mm/h (Henry, 1999).

Porém, a velocidade de sedimentação das hemácias no tubo, pode ser influenciada:

- pela forma do eritrócito que sofreu alterações morfológicas celulares, conferindo-lhe rigidez, baixando-a;
- pelas proteínas do plasma (fibrinogênio, albumina, globulinas) que interferem na carga negativa dos eritrócitos ou pela hemodiluição, aumentando-a (Henry, 1999).

A VSG também pode estar aumentada em condições fisiológicas como a gravidez e o envelhecimento.

Tabela II: Valores de referência adaptados de Henry, 1999

| | Sexo masculino (mm/h) | Sexo feminino (mm/h) |
|----------------|-----------------------|----------------------|
| Recém-nascidos | <2 | <2 |
| Adultos | <15 | <20 |
| Idosos | <30 | <42 |

2. Reticulócito (RET)

É um eritrócito jovem, que todavia contém um fino retículo basófilo, composto por cadeias de ARN, cuja observação é possível através de uma técnica supravital, recorrendo ao corante *azul brilhante de Cresil*. Após cerca de dois dias na medula óssea, os reticulócitos são libertados no sangue periférico e à medida que perdem o seu retículo basófilo convertem-se em eritrócitos maduros (Mc Donald et al, 1985).

No sangue periférico, devido à curta duração de vida, a contagem é baixa (0,2- 2%) (Dacie et al, 1984). Uma reticulocitemia absoluta tem mais utilidade que a percentagem, sendo uma análise de grande valor na avaliação da atividade da medula óssea e da eficácia da eritropoiese. A sua relevância será discutida mais adiante, junto das anemias (ver tabela V-eritrócitos).

3. Coloração de May-Grünwald-Giemsa

A coloração ajuda na avaliação dos esfregaços de sangue periférico. Em primeiro lugar, é usado um fixador como o metanol, e em seguida os corantes, que permitem a visualização das estruturas no sangue sabendo que o corante básico, como o *azul de metileno*, cora apenas estruturas basófilas (fortemente os ácidos nucleicos, basófilos e ligeiramente os neutrófilos), e o corante ácido, como a *eosina*, cora estruturas acidófilas (estrutura da hemoglobina e granulações dos eosinófilos) (Dacie et al, 1984).

4. Hemograma

O hemograma consiste na determinação do número de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, inclui a fórmula leucocitária e os índices eritrocíticos. Através de quantificação e da medição destas células, efetuadas pelo Cell-Dyn 3500, é possível detetar e distinguir tanto perturbações nos eritrócitos, como nos leucócitos ou nas plaquetas; para além de ser um indicador de bom prognóstico à terapêutica em alguns destes estados patológicos.

a. Princípio do funcionamento do aparelho automático

Os parâmetros hematológicos baseiam-se na medição de células em quatro canais independentes. Os glóbulos brancos (WBC) são analisados por dois canais distintos: o canal de fluxo ótico (WOC) para a contagem diferencial, e o da impedância (WIC) para a quantificação; os glóbulos vermelhos (RBC) e plaquetas (PLT) são medidos num segundo canal de impedância elétrica; ao passo que a hemoglobina (HB) é medida no canal de

espectrofotometria. Com base nos cálculos de Wintrobe, são igualmente obtidos os índices eritrocíticos: o hematócrito (HCT), a hemoglobina celular média (CHM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (manual Cell-Dyn, 1996).

i. Canal de fluxo ótico

No canal WOC, o sangue é diluído numa solução de *sheat* que mantém a integridade celular dos WBC, mas que torna os RBC transparentes ao laser, não interferindo desta forma na contagem dos WBC. Induzida pela geometria da célula de fluxo e pela corrente de *sheat*, a amostra diluída sofre então focagem hidrodinâmica, que obriga as células a formarem uma simples fila enquanto passam pela região de sensores, de forma a serem analisadas uma a uma.

Com referência à tecnologia MAPSS™ (*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*), são efetuadas quatro medidas simultâneas de dispersão da luz em cada leucócito:

- o ângulo 0° determina principalmente o tamanho da célula – o volume corpuscular médio (VCM);
- a dispersão da luz a 10° indica a estrutura ou a complexidade da célula (diferencia os mono dos polinucleares);
- a dispersão da luz a 90° separa as células granuladas como a lobularidade;
- a dispersão de luz despolarizada a 90° resolve os eosinófilos através da detecção dos grânulos. (figura 1) (manual Cell-Dyn, 1996).

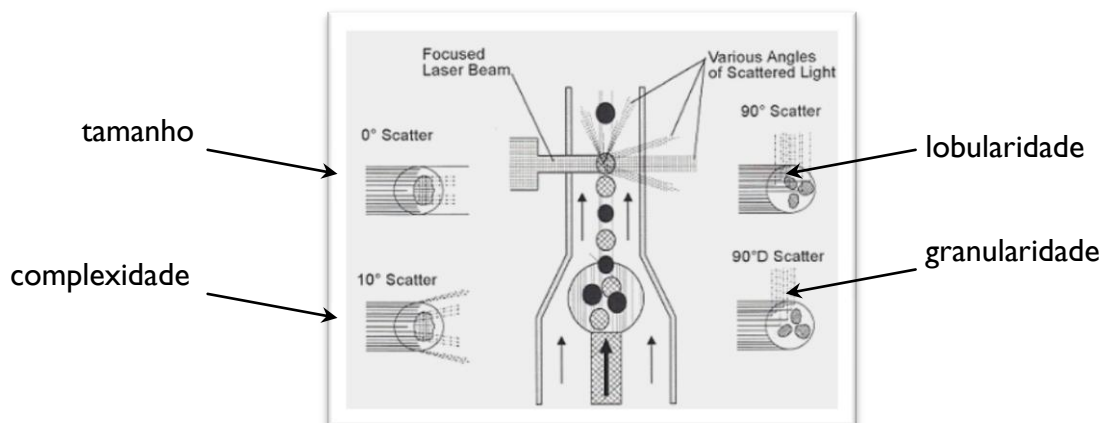


Figura 1- WBC Light Scatter (manual Cell-Dyn, 1996)

A informação das quatro medidas é interpretada através das alterações na luz dispersa pelas células, enquanto passam pelo detetor, dando a contagem diferencial para classificar a subpopulação dos WBC.

ii. Canal de impedância elétrica

Existem dois canais de impedância elétrica que determinam o WIC e o RBC/PLT individualmente. O método de impedância elétrica consiste numa suspensão de células, que são consideradas más condutoras, numa solução de condutividade elétrica, forçadas a passar uma a uma, por um orifício de tamanho conhecido. Esse orifício é ladeado por dois eléctrodos, de forma a criar um campo eléctrico. As alterações na corrente existente entre os eléctrodos, que ocorrem aquando da passagem das células resistentes, são detetadas e registadas sob a forma de impulsos. A quantidade gerada é indicativa do número de células que passam pela abertura, e a amplitude é proporcional ao volume da célula que o gerou, permitindo assim diferenciar pelo tamanho, no **canal RBC/PLT**, os eritrócitos das plaquetas. De facto, se o impulso gerado está acima do limiar inferior da PLT, é contado como tal; e se o impulso gerado está acima do limiar inferior dos RBC, é contado como um RBC (manual Cell-Dyn, 1996).

No **canal WIC**, a amostra de sangue é diluída com uma solução *diluyente*, que lisa os eritrócitos, tornando o citoplasma dos WBC mais visível. As medidas são interpretadas pelo Cell-dyn através das mudanças na impedância elétrica, à medida que as células passam pelo detetor.

É de referir que os dois métodos (ótico e impedância elétrica) permitem uma contagem mais precisa do número de WBC, na presença de certas substâncias interferentes ou em condições patológicas, embora o WOC seja o primeiro valor reportado como contagem dos WBC (manual Cell-Dyn, 1996).

iii. Canal de espectrofotometria

Depois de a contagem WIC estar concluída, a amostra é transferida para a célula de fluxo de hemoglobina. No canal de HB, a amostra é então diluída com a solução *CN-Free WIC/Hb Lyse*, que converte a hemoglobina num simples cromogéneo (*hemoglobinhydroxilamine complex*) (manual Cell-Dyn, 1996).

A leitura colorimétrica é efetuada por um detetor, que mede a luz transmitida a 540nm, sendo a concentração da hemoglobina diretamente proporcional à absorvância da amostra.

b. Índices eritrocíticos

O equipamento mede diretamente os parâmetros RBC, HB e MCV, indispensáveis para a determinação dos índices eritrocíticos HCT, HCM e CHCM. Os cálculos de Wintrobe foram introduzidos de forma a ajudar na caracterização morfológica das anemias (Henry, 1999):

-O HCT é o volume ocupado pelos RBC num dado volume de sangue, expresso em percentagem, sob a seguinte fórmula:

$$\text{HCT} = (\text{RBC} \times \text{MCV}) / 10$$

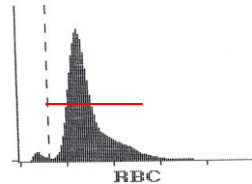
-O HCM avalia a quantidade de HB presente no RBC, expresso em picogramas, que se obtém pela seguinte fórmula: $\text{MCH} = (\text{HB}/\text{RBC}) \times 10$

-O CHCM estima a concentração média de HB presente nos RBC, expresso em percentagem, calculado pela seguinte expressão:

$$\text{CHCM} = (\text{HB}/\text{HCT}) \times 100$$

Existe ainda um índice de anisocitose, denominado RDW (largura de distribuição dos RBC), que é calculado pelo equipamento a partir do histograma dos RBC. É equivalente a um coeficiente de variação, em percentagem, obtido a 50% da altura do pico, usando a largura de distribuição dos RBC (manual Cell-Dyn, 1996).

Figura 2 - Histograma dos RBC



c. Interpretação do hemograma

Os parâmetros hematimétricos são úteis na avaliação e no acompanhamento de alterações eritrocitárias, leucocitárias ou plaquetárias. O conhecimento dos valores de referência permite classificar tais aumentos ou diminuições em qualquer um desses parâmetros, e associá-los a alguma eventual patologia ou doença, porém alguns fatores determinam importantes diferenças nos valores de referência, estando incluídos o sexo, a idade, a genética e a etnia entre outros.

i. Leucócitos

Encontram-se os valores de referência, ilustrados na tabela III, para um adulto de origem caucasiana.

Tabela III: valores absolutos e relativos da série branca (Henry, 1999)

| | | Valores de referência | |
|--------------|-------------|---------------------------------------|------------------|
| | | Valor Absoluto $10^9/L (=10^3/\mu L)$ | Valor Relativo % |
| WBC | Leucócitos | 4.4-11.0 | 100 |
| Subpopulação | Neutrófilos | 1.8-7.8 | 45-70 |
| | Eosinófilos | 0.0-0.45 | 0-6 |
| | Basófilos | 0.0-0.2 | 0-2 |
| | Linfócitos | 1.0-4.8 | 18-45 |
| | Monócitos | 0.2-0.8 | 4-10 |

O estudo da série branca permite evidenciar estados infecciosos e leucêmicos. Apesar de todos os leucócitos agirem na defesa do organismo as suas funções diferem. São observadas, na tabela IV, as diferentes causas que podem conduzir a alterações de cada uma das séries celulares.

É de referenciar que quando a concentração absoluta de cada célula está aumentada, a terminologia usada é -citose ou -filia; e quando está diminuída termina em -penia.

Tabela IV: Alterações nos parâmetros hematológicos da série branca e suas prováveis causas (Henry, 1999)

| | alteração | Causa e/ou patologia associada |
|-------------|-------------|--|
| WBC | | |
| Leucócitos | leucocitose | Infeção bacteriana, apendicite, leucemia, gravidez |
| | leucopenia | Infeção viral (sarampo, Citomegalovírus - CMV) |
| neutrófilos | neutrofilia | Infeção bacteriana, dano tecidual, reação leucemoide |
| | neutropenia | Febre tifoide, congénita grave, adquirida por fármacos |
| eosinófilos | eosinofilia | Alergia, parasitas, reação a fármacos |
| basófilos | basofilia | Varicela, varíola, LMC |
| linfócitos | linfocitose | Mononucleose infecciosa, CMV, EBV, toxoplasmose, LLC |
| monócitos | monocitose | Vírus, brucelose, malária, LMMC |

ii. Eritrócitos

Relativamente aos eritrócitos, a patologia mais frequentemente detetada pelos laboratórios de hematologia é a anemia, sendo esta confirmada quando a concentração de HB e/ou o HCT estão abaixo dos valores de referência. Na tabela V, encontram-se os valores de referência consensuais para um adulto de origem caucasiana.

Tabela V: valores de referência dos RBC e PLT (Henry, 1999)

| | Unidades | Valores de referência | |
|------|---------------------------|-----------------------|-----------|
| | | Mulher | Homem |
| RBC | $10^{12}/L (=10^6/\mu L)$ | 4.5-5.1 | 4.5-5.9 |
| HB | g/dL | 12.3-15.3 | 13.5-17.5 |
| HCT | % | 35.9-44.6 | 41.5-50.4 |
| VCM | fL (fentolitros) | 80-96 | |
| CHM | pg (picogramas) | 27.5-33.2 | |
| CHCM | % | 33.4-35.5 | |
| PLT | $10^9/L (=10^3/\mu l)$ | 150-450 | |

As principais alterações dos eritrócitos encontram-se representadas na tabela VI, assim como as suas prováveis causas:

Tabela VI: Alterações nos parâmetros hematológicos da série vermelha e suas causas (Henry, 1999; Miller et al, 1999)

| | alteração | Causa e/ou patologia associada | |
|-------------------|--------------|---|---|
| RBC | | | |
| RBC/HB/HCT baixos | anemia | Produção deficiente na MO (RET baixo), ou sangramento (RET alto), ou hemólise (RET alto) | |
| RBC/HB/HCT altos | eritrocitose | EPO aumentado (poliglobulia 2 ^{aria}) EPO diminuído ou normal (Policitemia vera =PV) | |
| MCV | G | microcítico | Anemia ferropriva (RET baixo), talassémia (RET N.) Anemia sideroblástica |
| | | normocítico | Anemia de transtorno crónico (RET baixo ou normal) Anemia hemolítica (RET alto) |
| | | macrocítico | Hepatopatia, alcoolismo, anemia megaloblástica (deficiência Folato, RET baixo), anemia perniciosa (deficiência vitamina B ₁₂) |
| HCM | hipocromia | Secundaria a um déficit de ferro Talassémia (RET baixo), hemoglobinopatia | |
| | normocromia | Anemia de transtorno crónico (RET baixo ou normal) Anemia hemolítica (RET alto) | |
| | hipercromia | Esferocitose hereditária | |

Portanto, a interpretação de um hemograma, tanto na série vermelha como na série branca, pode ajudar a estabelecer um diagnóstico, não esquecendo que pode ser útil no seguimento de tratamentos tóxicos, tais como radio ou quimioterapia, e é um indicador de bom prognóstico na terapêutica de alguns destes estados patológicos.

d. Diagnóstico diferencial de anemia

Como foi referido, a anemia caracteriza-se por diminuição da massa eritrocitária no sangue circulante e/ou por diminuição da concentração de hemoglobina, podendo ser classificada de acordo com a origem da **diminuição da massa eritrocitária**. Porém, o estudo de uma anemia pode ser orientado pelo:

-**VGM**, que nos permite classificar as anemias como microcíticas, normocíticas e macrocíticas (ver tabela VI);

-**HGM**, qualificando as anemias de hipocrómicas, normocrómicas e hiperocrómicas (ver tabela VI);

-a **contagem de reticulócitos**, que distingue as anemias regenerativas (valores altos de reticulócitos) das anemias arregenerativas (valores diminuídos de reticulócitos).

O primeiro princípio da terapia deve ser a identificação e correção da causa de base, daí a necessidade de classificar corretamente a anemia. Para esse efeito deverá ser solicitado, para além do hemograma, a realização de uma série de determinações analíticas complementares, incluindo o estudo do metabolismo férrico, vitamina B₁₂ e ácido fólico, reticulocitemia, bioquímica geral e a realização de um esfregaço sanguíneo. (Aefa tema 8 , 2011)

i. Diminuição da massa eritrocitária

Os nutrientes mais importantes para a produção adequada de eritrócitos são o ferro, a vitamina B₁₂ e o ácido fólico. Logo, uma taxa reduzida de eritrócitos pode ser resultado de uma **eritropoiese ineficaz**, devido a uma deficiência em vitamina B₁₂ ou ácido fólico, originando uma anemia megaloblástica. De igual modo, um distúrbio no metabolismo do ferro pode conduzir a uma anemia ferropriva (Merck Sharp & Dome, vol.10).

A anemia por deficiência de vitamina B₁₂, também conhecida como anemia perniciosa, deve-se à inadequada absorção dessa vitamina por falta de produção no estômago da proteína transportadora – *o fator intrínseco*. De igual modo, a deficiência de ácido fólico é devido a uma defeituosa absorção, acarretada pela doença de Crohn, alguns medicamentos, alcoolismo ou eventualmente a uma necessidade aumentada tal como acontece na gravidez.

Uma **perda excessiva** na corrente sanguínea, provocada por uma hemorragia aguda ou crónica, bem como uma **diminuição na sobrevida dos eritrócitos** ocasionada por anomalias na membrana ou no seu interior, reações autoimunes (na anemia hemolítica autoimune – AHAI), ou por lesões dos eritrócitos de causa mecânica, contribuem para uma diminuição da massa eritrocitária. A subsequente hemólise pode ser detetada por níveis altos

de bilirrubina indireta e de lactato desidrogenase, e nível baixo de haptoglobina, assim como uma urina escura (presença de metahemoglobina).

ii. Anomalia dos eritrócitos

O eritrócito normal possui forma de disco bicôncavo que lhe confere a flexibilidade necessária para circular pelos vasos estreitos. As formas anormais, devidas a membranas frágeis ou à falta de enzimas para o seu bom funcionamento, que ocorrem em determinadas perturbações hematológicas, podem levar à destruição dos eritrócitos e verificam-se na eliptose (alteração na espectrina), na esferocitose (fragilidade membranar) e nas enzimopatias (com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase G-6-PDH, ou 5-nucleotidase) (Merck Sharp & Dome, vol.10).

iii. Anomalia da hemoglobina

O eritrócito que contém hemoglobina anormal pode deformar-se ou perder a capacidade de fornecer uma quantidade adequada de oxigênio aos tecidos, situação que se verifica na drepanocitose.

Nas talassémias, ocorre redução da síntese das cadeias de hemoglobina, sendo que na talassémia beta as cadeias beta, codificadas por dois genes, produzem-se em quantidades reduzidas, e na talassémia alfa é a produção de cadeias alfa, codificadas por quatro genes, que está alterada. A talassémia beta pode ainda ser classificada como *maior* ou *menor*, de acordo com o estado do paciente ser homocigoto ou heterocigoto, respectivamente.

Nas hemoglobinopatias (C, S, D, E), verifica-se uma alteração estrutural ou funcional da hemoglobina, devido à presença de uma mutação pontual numa das cadeias. Pode ser útil a realização de uma eletroforese de hemoglobina de modo a determinar o tipo de talassémia (alfa ou beta) ou identificar uma eventual hemoglobinopatia (Garcia -Erce et al , 2011).

Como consequência da menor produção de hemoglobina, as hemácias resultantes são hipocrômicas e microcíticas, sendo classificadas como tal.

iiii. Outras causas

A insuficiência renal, a doença hepática, a doença endócrina ou a doença crônica também podem originar anemia por insuficiente produção de eritrócitos, cujas causas são muito variadas. Na anemia aplástica é encontrada pancitopenia, associada à redução severa

do tecido hematopoiético, que resulta numa produção deficiente de células sanguíneas tais como as plaquetas e os neutrófilos (Henry, 1999).

e. Resumo do diagnóstico diferencial de anemia

É frequente nas anemias, o achado de eritrócitos anómalos, exibindo alterações de tamanho, forma e coloração. Encontram-se resumidas, na tabela VII, as diferentes causas, anemias associadas e o esfregaço sanguíneo típico.

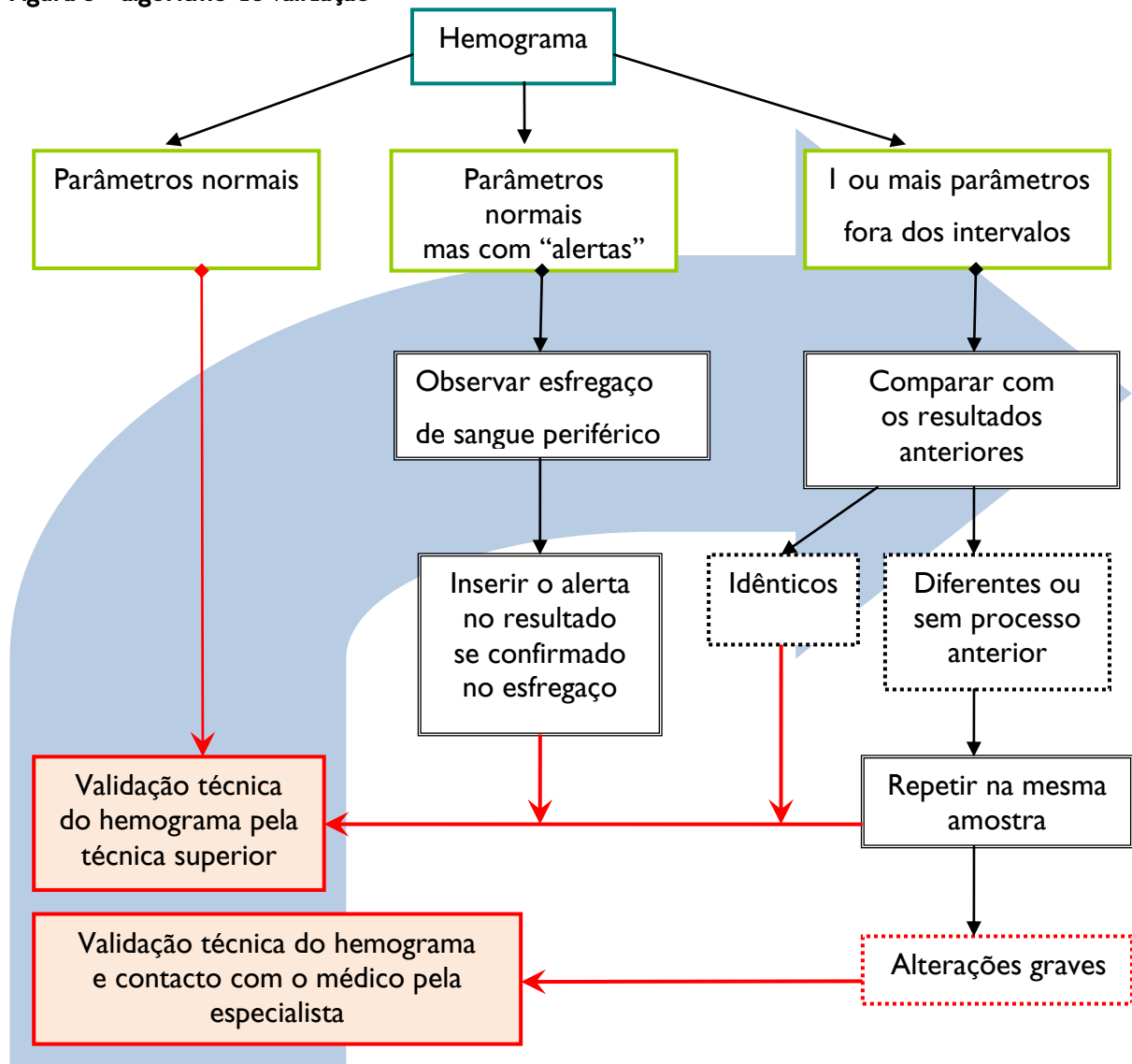
Tabela VII: diagnóstico diferencial de anemia (Henry, 1999; Merck Sharp & Dome, vol.10)

| | Causas | Doença associada | Esf.sang. típico |
|-----------------------------------|--|-----------------------------|--|
| Produção deficiente de RBC | | | |
| Eritropoiese ineficaz | -deficiência em ferro | -anemia ferropriva | -micrócitos |
| | -deficiência em folato | -anemia megaloblástica | -macrócitos |
| | -deficiência em vitamina B ₁₂ | -anemia perniciosa | -macrócitos -neutrófilos hipersegmentados |
| Outras | -deficiência na absorção | -anemia de doença crónica | -anisocitose -poiquilocitose |
| | -EPO baixa | -anemia de insufic. renal | |
| | -hemólise, absorção | -anemia de doença hepática | |
| | -produção diminuída pela MO | -anemia de doença endócrina | |
| | -redução do tecido hematopoiético | -anemia aplástica | -pancitopenia |
| Perda de RBC | | | |
| Hemorragia excessiva | -acidente, cirurgia | -hemorragia aguda | anisocitose -poiquilocitose |
| | -hemorroides, úlceras | -hemorragia crónica | |
| Hemólise acelerada | | | |
| Lesão dos RBC | -mecânica | -anemia microangiopática | -esquizócitos |
| Fatores extrínsecos | -reação autoimune | -AHAÍ idiopática | |
| Anomalia RBC | -defeito na forma | -eliptocitose | -eliptócitos |
| | -defeito na membrana | -esferocitose hereditária | -esferócitos |
| | -defeito nas enzimas | -deficiência G6PDH | -corpos de Heinz |
| | | -deficiênc. 5-nucleotidase | -pontuado basófilo |
| Anomalia da HB | -defeito na quantidade | -talassémias alfa e beta | -células em alvo -pontuado basófilo |
| | | -hemoglobinopatias | -Howell Jolly |
| | -defeito na qualidade | -drepanocitose (Hb C) | -em forma de foice |

f. Algoritmo de validação do hemograma

A validação técnica do hemograma segue determinados passos, de acordo com os resultados obtidos pelo equipamento (figura 3).

Figura 3 - algoritmo de validação



5. Hemostase

A hemostase é um processo complexo pelo qual o organismo assegura, em permanência, a prevenção dos sangramentos espontâneos e a paragem das hemorragias resultantes da descontinuidade vascular. Essa função fisiológica implica o envolvimento do endotélio vascular, das plaquetas, e de proteínas plasmáticas que atuam como fatores de coagulação, ativadores e inibidores de coagulação e da fibrinólise (Caen et al, 1980).

O processo é composto por três fases distintas que se interligam de forma contínua ao longo do tempo. Na **hemostase primária** ocorre vasoconstrição, adesão e agregação plaquetar, graças à interação dos vasos, plaquetas, e fator de von Willenbrand (vW). Em poucos minutos, atinge-se a paragem do sangramento com formação do trombo plaquetar. Seguidamente, a **coagulação** ativa o sistema procoagulante que consegue a paragem definitiva do sangramento por formação de fibrina, consolidando o agregado plaquetar. Nesta fase, é também ativado o sistema inibidor, mas somente quando o coágulo já não é necessário. Por fim, 48 a 72 horas após a lesão tecidual, dá-se a **fibrinólise** que permite regressar a um estado dito “normal” por destruição da fibrina, lise do coágulo, e restauração da integridade vascular (Caen et al, 1980).

Num indivíduo saudável, o mecanismo fisiológico da hemostase mantém-se num equilíbrio dinâmico, pelo controlo permanente dos mecanismos ativadores e inibidores da coagulação. No entanto, esse equilíbrio pode vir a ser interrompido por qualquer variação qualitativa ou quantitativa dos componentes acima referidos, proporcionando um risco hemorrágico ou trombótico.

A avaliação laboratorial da hemostase é possível através de testes simples, suficientemente sensíveis e reprodutíveis, escolhidos de maneira a explorar as distintas fases. Serão expostos, somente, os testes efetuados no laboratório Virgílio Roldão, ou seja os que envolvem componentes das duas primeiras fases da hemostase.

a. Avaliação laboratorial dos principais testes

i. Exploração da hemostase primária

No **tempo de sangramento**, segundo o método de Duke, é efetuada uma incisão no lóbulo da orelha com uma agulha descartável, de modo a avaliar conjuntamente a resposta das plaquetas a uma lesão dos tecidos e a capacidade de vasoconstrição do endotélio, com ajuda do fator de von Willenbrand e do fibrinogénio (Sultan et al, 1978).

A gota de sangue é recolhida de 30 em 30 segundos em papel de filtro, até parar a hemorragia. O tempo é reportado em minutos (Valor de referência: 2 a 4 minutos).

O tempo de sangramento depende muito da profundidade e extensão da incisão praticada, sendo por isso um teste com sensibilidade relativa. Apresenta mais falhas, já que a vasoconstrição pode levar a um sangramento normal, mesma na presença de alterações na contagem das plaquetas (contagem superior a 100.000 plaquetas/ μ L) (Sultan et al, 1978).

A **contagem de plaquetas** é preferencialmente escolhida para a avaliação global do mecanismo da hemostase primária. Paralelamente, é importante a observação do **esfregaço sanguíneo** para verificar a presença de plaquetas gigantes, variações na morfologia e eventualmente agregação, permitindo assim a avaliação da funcionalidade das mesmas.

(Valor de referência: 150.000 a 450.000/ μL) (Henry, 1999)

É importante referenciar que o esfregaço sanguíneo é feito no momento da colheita sem adição de anticoagulante, permitindo assim detetar falsas trombocitopenias em pacientes cujo organismo contém aglutininas dependentes de EDTA. Nesses casos, as pessoas são informadas desse “síndrome de aglutinação pelo EDTA” e a contagem das plaquetas pelo analisador, passa a ser feita imediatamente a seguir à colheita.

ii. Exploração da coagulação

A formação do coágulo envolve a interação sequencial de várias proteínas plasmáticas denominando-se assim a cascata de coagulação, sendo o intuito final a geração de fibrina insolúvel a partir de um precursor solúvel – o fibrinogénio (fator I).

A síntese dos fatores envolvidos na cascata ocorre a nível hepático e tem a particularidade dos fatores II, VII, IX e X carecerem de vitamina K. Hoje em dia, os testes de rotina baseiam-se no modelo clássico da coagulação *in vitro* e permitem distinguir, consoante os fatores envolvidos, duas vias da cascata – a intrínseca e a extrínseca (Henry, 1999).

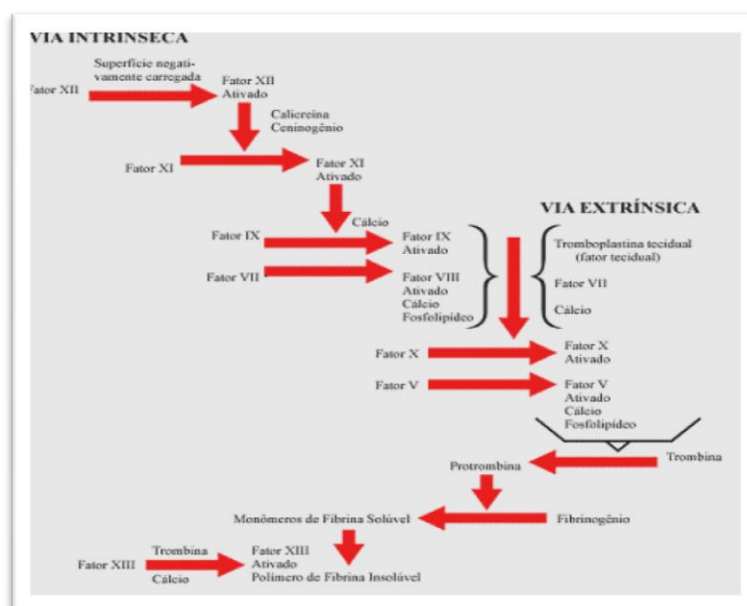


Figura 4 - modelo clássico da coagulação *in vitro*

➤ **Via extrínseca (fatores I, II, V, VII, X)**

O **tempo de protrombina (TP)** permite medir globalmente a eficácia da via extrínseca por ser sensível às variações de concentração de 3 dos 4 fatores dependentes da vitamina K – II, VII e X (Caen et al, 1975).

Os anti-vitamina K, usados no tratamento anticoagulante oral, são antagonistas estruturais da vitamina que impedem a sua ação ao nível do hepatócito durante a síntese dos fatores dela dependentes. Portanto, o tempo de protrombina está indicado para a monitorização terapêutica com anticoagulantes orais (Miller et al, 1999).

O processo de coagulação é desencadeado pela adição em excesso de tromboplastina com cálcio ao plasma citratado, pobre em plaquetas, do qual resulta a formação de um coágulo de fibrina. O tempo é medido desde a adição de tromboplastina até ao início da coagulação.

Vários estudos internacionais demonstraram que, na terapêutica com anticoagulantes orais, podem ocorrer alterações significativas dos resultados conforme o reagente de tromboplastina e o analisador, utilizados nas medições. Para solucionar esta variação, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), foi introduzido um procedimento de padronização internacionalmente válido para a tromboplastina, tendo em conta o seu valor de ISI (Índice de Sensibilidade Internacional) fornecido pelo fabricante (Besselaar, 1991).

O analisador calcula automaticamente o INR (Razão Normalizada Internacional), recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP paciente}}{\text{TP "pool" normal}} \right)^{\text{ISI}}$$

Nota: o resultado do TP da “pool” de plasma normal é obtido através da média aritmética do tempo de coagulação de 20 plasmas normais.

Valores de referência:

- Pacientes normais: 0.9 a 1,1 INR e 70 a 100%;
- Pacientes com terapia anticoagulantes orais: o INR e a % variam consoante a patologia associada.

O seguimento do tratamento com anticoagulantes orais é indispensável, porque do resultado obtido depende o ajuste da posologia, reduzindo-se o risco de hemorragia ou trombose.

Tabela VIII: valores terapêuticos de INR e em percentagem

| Patologias | INR | % |
|--|-----------|---------|
| -Trombose venosa profunda -Embolismo pulmonar -Doença trombótica arterial (incluindo enfarte miocárdio) | 2,0 – 3,0 | 40 – 20 |
| -Válvulas cardíacas artificiais | 3,0 – 4,0 | 20 – 15 |

➤ **Via intrínseca (fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII)**

O tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) é utilizado na avaliação da eficácia da via intrínseca, devido à sua sensibilidade relativamente a deficiências ou anomalias nos fatores VIII, IX, XI, XII, precalicreína e fibrinogénio (Cole et al, 1984). Está pois indicado para a monitorização terapêutica com heparina intravenosa, obrigando ao controlo do parâmetro, que deve ser mantido entre 1,5 e 2,5 vezes o valor dos controlos (ver em <http://www.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=heparina&rbI=0&x=8&y=6>)

APTT é também sensível aos anticorpos presentes no lúpus, que são dirigidos contra os componentes fosfolípidos envolvidos na ativação dos fatores de coagulação, comportando-se como inibidores do fator VIII (Henry, 1999).

Com ajuda deste parâmetro, pode ser feito o rastreio de distúrbios congénitos tais como hemofilia A e B e a doença de von Willenbrand (vW), todos causados por um defeito do cromossoma X (Henry, 1999). Para podermos fazer o diagnóstico da hemofilia A e B, é necessário avaliar a atividade qualitativa ou quantitativa dos fatores VIII e IX, respetivamente, constatando a sua deficiência. Para a doença de von Willenbrand, verifica-se uma deficiência no fator de vW e não no fator VIII. Numa situação normal, este fator forma um complexo com o fator VIII, servindo-lhe de transportador, o que fica comprometido na doença.

É medido o tempo de coagulação de um plasma citratado, pobre em plaquetas, na presença de cálcio, de uma solução de fosfolípidos (cefalino) e de um ativador de fatores sólidos (ácido elágico). O processo de coagulação é desencadeado com a adição dos iões cálcio até à formação de fibrina.

O valor é determinado em segundos, mas pode também ser apresentado sob forma de ratio, obtido a partir da seguinte fórmula:

b. Interpretação de resultados

Quando existem alterações na hemostase, o conhecimento dos fatores envolvidos em cada uma das vias é determinante na avaliação das mesmas. Na tabela VIII está resumida a interpretação dos resultados obtidos na avaliação da coagulação, quando estes se encontram alterados ou não.

Tabela VIII: interpretação de resultados da coagulação (Henry, 1999)

| Fases de coagulação/ parâmetros | | Anomalia | Patologia/ Procurar a causa |
|------------------------------------|--------|--|---|
| -Hemostase primária | | | |
| Tempo de sangramento | | Endotélio vascular? Plaquetas? Ou fator vW? | -Trombocitopenia ou Trombopatia -ou doença de Von Willenbrand |
| Contagem de plaquetas | | -Diminuição de produção | -Danos medular (aplasia) -Produção ineficaz (def.º Vit. _{B12} , Fol.) -Terapêutica com AINEs |
| | | -Anomalia de distribuição | -Esplenomegalia (hepatopatia) |
| | | -Não imune | -CID -Síndrome Hemolítico Urémico |
| | -Imune | -Lúpus Eritematoso sistêmico (SLE) -PTI | |
| | | -Primária | - Trombocitemia essencial (ET) |
| | | -Secundária | - Reativa: estimulação MO |
| -Via intrínseca/extrínseca | | | |
| TP | PTT | | |
| N | N | Não há deficiência de fatores de coagulação | Não há doença associada |
| | | Deficiência de fatores: I, II, V, VII, X | -Anticoagulante oral (deficiência do complexo protrombínico) -Carência vit.K (défice ou absorção) -Hepatopatia grave (mais o fator V) -CID (défice de fatores I, II, V, VIII) |
| N | | Deficiência de fatores: VIII, IX, XI, XII (qualitativa ou quantitativa) | -Anticoagulante I.V. heparina -Hemofilia A (deficit f. VIII: <40U/dl) -Hemofilia B (deficit f. IX) -Anticoagulante lúpico (inibidor fVIII) -Doença de von Willenbrand (defic. f. vW, transportador de f.VIII) |
| | N | Deficiência isolada de fator VII | -Hereditário ou adquirido |
| Fibrinogénio | | | |
| | | Deficiência de fator I: Hipo ou Afibrinogénia | -Hepatopatia grave -CID |

Capítulo 2 - Imuno-hematologia

A Imuno-Hematologia eritrocitária, é uma área essencialmente laboratorial que tem como objetivo garantir a segurança imunológica da transfusão, da transplantação e da gravidez. Como tal, abrange o estudo laboratorial no contexto clínico da interação dos eritrócitos com o sistema imunitário através do grupo sanguíneo e das provas de Coombs.

I. Coombs direto e indireto

Os eritrócitos comportam-se como partículas eletronegativas nos estudos de migração eletroforética, sendo justamente essa eletronegatividade da membrana, que gera a forte repulsão existente entre eles e os impedem de se aglutinarem quando em suspensão em meio salino. Um dos fenómenos que possui a capacidade de diminuir a carga elétrica dos eritrócitos ao ponto de levá-los à aglutinação, é a ligação com determinado anticorpo.

Existem dois tipos de anticorpos: os chamados “aglutinantes” ou completos, que causam aglutinação dos eritrócitos, em solução fisiológica a 0,85%, quando se fixam à membrana eritrocitária; e os chamados “não aglutinantes” ou incompletos, quando são incapazes de provocar a aglutinação *in vitro* (Miller et al, 1999).

A visualização das reações dos anticorpos incompletos depende de certos artifícios de técnica, cujo melhor recurso, é a prova da antiglobulina humana ou prova de Coombs, que vai revelar a existência desses anticorpos na membrana eritrocitária. Para esse fim, existe a prova indireta, que permite a pesquisa e a identificação dos anticorpos livres no plasma e a prova direta, que é usada para a deteção dos anticorpos ligados aos antigénios dos eritrócitos (Miller et al, 1999).

a. Coombs indireto

A prova consiste em incubar o soro suspeito na presença de eritrócitos Rh+ suspensos em solução fisiológica a 37°C. Como os anticorpos de soro de Coombs podem reagir com qualquer globulina humana, é necessário na execução da prova, lavar os eritrócitos antes de se acrescentar o soro de Coombs, a fim de remover qualquer vestígio de plasma, deixando-os apenas recobertos com os anticorpos específicos que estão a ser pesquisados.

Em casos positivos, as aglutininas do soro fixar-se-ão à superfície dos eritrócitos que, lavados e expostos à ação do soro de Coombs, sofrerão aglutinação. Logo, o soro do paciente demonstra a existência de anticorpos não aglutinantes (Dacie et al, 1984). Este teste é usado em gestante Rh negativa suspeita de estar sensibilizada pelos antígenos do sistema Rh e na imunização pós-transfusional (politransfusões).

b. Coombs direto

A prova consiste em incubar as células, suspeitas de estarem sensibilizadas, com soro de Coombs. Os anticorpos incompletos, quando em contacto com o antígeno à superfície dos eritrócitos, fixam-se na membrana dos mesmos bloqueando o antígeno, não tendo, capacidade para os aglutinarem. O soro de Coombs é então capaz de promover a aglutinação dos eritrócitos sensibilizados (Dacie et al, 1984). Este teste é usado no estudo da doença hemolítica do recém-nascido e na anemia hemolítica autoimune no adulto.

2. Grupos sanguíneos

O mecanismo de identificação dos grupos sanguíneos baseia-se no facto que os indivíduos têm anticorpos (aglutininas) contra os antígenos (aglutinogénios) que não possuem. Os principais antígenos eritrocitários e seus anticorpos correspondentes mais utilizados nas avaliações de imuno-hematologia de rotina, são o sistema ABO e o rhesus Rh porque têm maior probabilidade do que os outros grupos de provocar reação transfusional. Por consequente utiliza-se, para a classificação do sistema ABO, o soro anti-A e anti-B, e o soro anti-D para a classificação dos grupos Rh positivo, negativo e fracamente positivo (variante Du). É notório reportar, que a variante Du é avaliada em todos os casos em que o Rh é negativo, através de uma prova de Coombs direto (Guyton, 1996).

A reação transfusional é caracterizada pela aglutinação e subsequente lise dos eritrócitos, provocada pelos anticorpos que ativaram o sistema do complemento. Se a situação de incompatibilidade não for detetada a tempo, instala-se uma insuficiência renal aguda que pode levar à morte do doente. Ainda assim, é primordial estabelecer um grupo correto RhD na prática transfusional segura, senão pode haver falhas (Miller et al, 1999):

- na administração de anti-D profilático a uma mulher grávida RhD negativo (sensibilizada pelos antígenos do sistema Rh);
- em reações hemolíticas graves (adquiridas);
- na transplantação de órgão.

É realizado um **teste globular**, através da identificação dos antígenos A ou B à superfície dos eritrócitos humanos, por um método de aglutinação direta com anticorpos monoclonais do tipo IgM, que conferem uma maior especificidade e avidéz à reação de aglutinação.

A interpretação dos resultados está ilustrada nas tabelas IX-1 e IX-2.

+ : aglutinação **-** : ausência de aglutinação

Tabela IX-1: sistema ABO (Miller, 1999)

| Antígeno eritrocitário | Anti-A | Anti-B |
|------------------------|--------|--------|
| A | + | - |
| B | - | + |
| AB | + | + |
| 0 | - | - |

Tabela IX-2: sistema rhesus (Miller, 1999)

| Rhesus | Anti-D |
|-----------------|--------|
| Rhesus positivo | + |
| Rhesus negativo | - |

De forma a comprovar os resultados precedentes, é necessário efetuar um **teste plasmático**, de modo a observar a presença ou ausência de anticorpos anti-A e/ou anti-B no plasma. No entanto, verificam-se algumas limitações deste teste, uma vez que os fenótipos A e B fracos podem ser mais difíceis de detetar (Miller et al, 1999). Por essa mesma razão, após várias tentativas, desistimos desse teste e baseamo-nos simplesmente na eficácia do teste globular, que utiliza anticorpos monoclonais específicos, para a interpretação do grupo sanguíneo.

Capítulo 3 - Imunologia

Existem seis principais categorias de imunoenaios que se enquadram na quantificação de diferentes classes de testes como: hormonas endócrinas, marcadores de hepatites e do Vírus da Imunodeficiência Humana, marcadores tumorais, marcadores cardíacos, testes metabólicos, serologia infecciosa e alergologia.

O doseamento, da grande maioria dos analitos em imunologia, é possível através de sofisticados equipamentos automatizados, cuja sensibilidade e especificidade permite detetar analitos com concentrações na escala de picomolar a nanomolar.

Atualmente encontra-se disponível no mercado, uma grande variedade de imunoenaios cujas técnicas empregues variam desde a precipitação, passando pela cromatografia, a fluorescência, a eletroquimioluminescência, etc.

Todas as técnicas usadas baseiam-se nas características de reconhecimento específico do imunocomplexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac), sendo a sua deteção possível através de marcadores como enzimas, radioisótopos ou compostos fluorescentes (Heres et al, 2010). Serão discutidos neste capítulo somente os imunoenaios empregues no laboratório.

I. Princípio dos imunoenaios

a. Imunoensaio de precipitação

É o método mais simples de reação entre antígeno e anticorpo, sem uso de marcadores, cujo complexo formado é visível a olho nu, sob a forma de precipitado, em placa (Henry, 1999). Geralmente é um teste qualitativo mas pode ser também semi quantitativo, se forem efetuadas diluições, em série, da amostra em solução salina fisiológica. As análises baseadas nesse método são técnicas manuais tais como: *Widal*, *Wright*, *Weil-Felix*, *Paul-Bunnell*, *Waller-rose*, e *VDRL* (Venerean Disease Research Laboratory).

b. Imunocromatografia

Um ensaio imunocromatográfico do tipo *sandwich*, desenvolve-se numa membrana de nitrocelulose fixa sobre um suporte. A amostra do fluido biológico (soro ou urina), contendo o analito a determinar, migra ao longo da *tira teste* e percorre o papel de filtro. Num primeiro instante, o analito interage com um conjugado corado, composto por um anticorpo anti-analito, seguidamente este complexo é capturado por outro anticorpo anti-analito, que se encontra imobilizado mais adiante na linha teste, desenvolvendo-se uma coloração quando

a concentração do analíto é superior ao limite de detecção. Na ausência do analíto não se desenvolve cor na linha teste. Como controle da reação, o excesso de conjugado não complexado ao analíto é capturado por anticorpos específicos presentes na *linha controle*, indicando o bom funcionamento do teste (Henry, 1999).

Este tipo de imunoensaio é usado para o diagnóstico precoce de gravidez, através da detecção qualitativa da gonadotropina coriônica humana (hCG), na urina.

c. Imunoensaio enzimático

Os imunoensaios que usam enzimas como marcadores, foram desenvolvidos como alternativa aos radioisótopos. Os mais frequentemente utilizados são os ensaios imunosorventes enzima-ligados (ELISA) e os ensaios imunoenzimáticos (EIA). Dependente do substrato escolhido, o método de ensaio pode ser definido como um ensaio enzimático fluorescente (ELFA) ou um ensaio eletroquimioluminescente (ECLIA) (Henry, 1999).

O método ELISA é caracterizado como ensaio **homogéneo e heterogéneo**, atendendo ao número de fases utilizadas nas reações, mas também pode ser diferenciado como **competitivo ou não competitivo**. Preferencialmente são utilizados ensaios heterogéneos em detrimento dos homogéneos, apesar de serem mais morosos, porque teem maior versatilidade, permitindo detetar haptenos, antigénios macromoleculares e anticorpos.

➤ Método competitivo

É usado, principalmente, para a detecção de antigénio de uma amostra, utilizando um anticorpo imobilizado numa matriz sólida. O antigénio marcado encontra-se em concentrações pré-estabelecidas, logo quanto mais amostra houver menor será a fluorescência, ou seja, o valor do sinal de fluorescência é inversamente proporcional à concentração dos determinantes antigénicos presentes na amostra (figura 6) (Heres et al, 2010).

A curva de calibração associada ao método está ilustrada na figura 7.

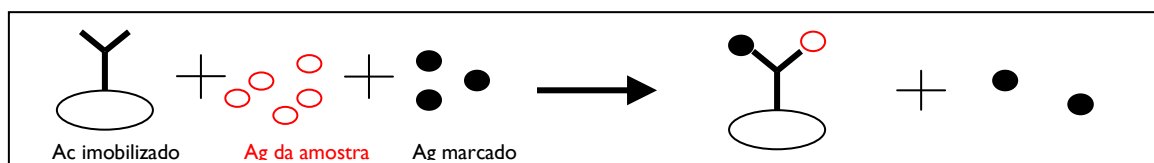


Figura 6 - método competitivo de um ensaio heterogéneo para a determinação de antigénios

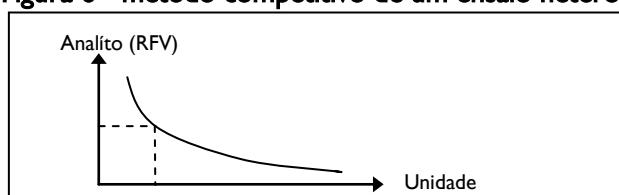


Figura 7 - curva de calibração do método competitivo

➤ **Método não competitivo (método *sandwich*)**

Geralmente é utilizado, de igual modo, para a deteção de um antígeno (figura 8) ou de um anticorpo (figura 9). O valor do sinal de fluorescência é proporcional à concentração do anticorpo ou/ antígeno presente na amostra. A curva de calibração, representada na figura 10, diz respeito ao antígeno ou/ anticorpo pesquisado na amostra.

-deteção de um antígeno (Ag):

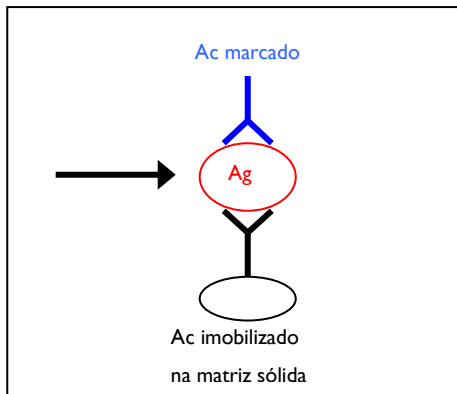


Figura 8 - método não competitivo de um ensaio heterogéneo para a determinação de antígenos

-deteção de um anticorpo (Ac):

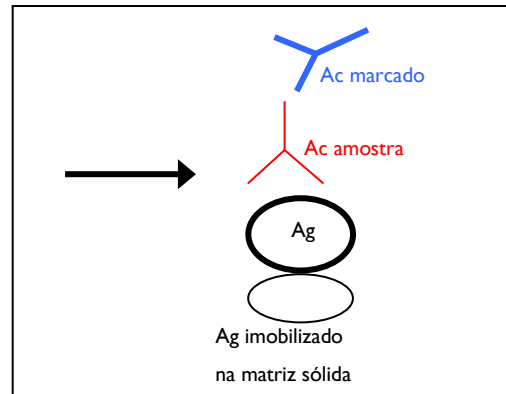


Figura 9 - método não competitivo de um ensaio heterogéneo para a determinação de anticorpos

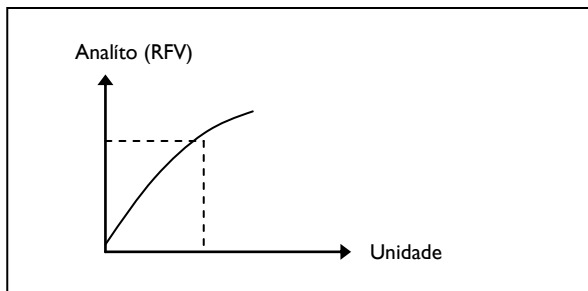


Figura 10 - curva de calibração do método não competitivo

i. Ensaio enzima-ligado fluorescente (ELFA)

O equipamento VIDAS (Vitek Imuno Diagnostic Assay Sistem) da Biomerieux tem por base o método de ELISA, com uma deteção do ponto final por fluorescência. Após incubação da amostra com um anticorpo /ou antígeno marcado pela fosfatase alcalina, sucedem-se etapas de lavagem de forma a remover os componentes e o conjugado não ligado. Na etapa final de revelação, a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise do substrato 4-metil-umbeliferilfosfato (4-MUP) em 4-metil-umbeliferona (4-MU), do qual resulta emissão de luz a 450nm após excitação a 370nm.

Os resultados são calculados automaticamente, a partir da curva de calibração introduzida no aparelho (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda).

Na maioria dos casos são usados anticorpos monoclonais, que fornecem especificidade e sensibilidade na medição dos analitos: CA125, CA15.3, CA19.9, T3, T4, Citomegalovirus, Rubéola, Toxoplasmose, marcadores da hepatite A e B, VIH 1 e 2, alergénios IgE específicos, IgE, Progesterona e Testosterona.

ii. Imunoensaio eletroquimioluminescente (ECLIA)

O equipamento COBAS 6000-Modular e601 da Roche Diagnostics utiliza compostos químicos, que geram luz de forma eletroquímica, por reação redox.

Os imunoensaios eletroquimioluminescentes são do tipo heterogéneo, utilizando micropartículas magnéticas, para realizar a separação das frações ligadas e livres através de um íman (Henry, 1999).

Para a realização do ensaio de tipo *sandwich*, o anticorpo primário (anticorpo monoclonal biotilado específico anti-análito) se imobiliza nas micropartículas magnéticas (estreptavidina) mediante a interação estreptavidina-biotina e o anticorpo secundário (anticorpo monoclonal específico anti-análito) se marca com um complexo de ruténio. Da incubação com a amostra resulta um complexo *sandwich*. A mistura é então aspirada para a célula de leitura onde micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são removidos pelo reagente *procell*. Após a aplicação de uma corrente elétrica, é induzida uma emissão quimioluminescente produzida pela redução química do ruténio 3+ a ruténio 2+, que é medida por um fotomultiplicador (Roche e-LabDoc).

Os ensaios efetuados por este método são: TSH, FT3, FT4, A-TPO, A-TG, Tiroglobulina, LH, FSH, PRL, EII, PSA, PSAL, CEA, AFP, HCV, Ferritina, Vitamina B12, Folato.

iii. Ensaio imunoenzimático (EIA)

O ensaio EIA é um método qualitativo, geralmente usado como auxiliar ao diagnóstico de doenças autoimunes localizadas ou sistêmicas (Henry, 1999). No laboratório é usado para a deteção dos anticorpos antinucleares. A técnica baseia-se no método ELISA, recorrendo à fosfatase alcalina, conjugada com um anticorpo anti-humano. A deteção de anticorpos na amostra é revelada, a olho nu, pelo aparecimento de uma mancha (*dot*) no suporte sólido de membrana, na qual está imobilizado o respetivo Ag. A validação do teste efetuado pode ser comprovada pelo aparecimento de uma mancha no local do controlo positivo e a ausência da mesma no local do controlo negativo.

2. Imunoensaios

a. Marcadores tumorais

Um marcador tumoral define-se como uma substância, produzida pelas células tumorais (antígeno, hormona, mucina) ou produzida pelo hospedeiro em resposta à presença de um tumor (citocina e proteínas de fase aguda).

Na maioria dos casos, os marcadores tumorais não são úteis no diagnóstico do cancro, mas sim no seguimento do tratamento de pacientes com tumores diagnosticados. Porém, alguns deles podem ser usados de forma eficaz no diagnóstico precoce em grupos de alto risco, quando os marcadores possuem uma especificidade muito elevada (hormona hCG, calcitonina e alfa-fetoprotéina) ou como análise complementar no diagnóstico em pacientes cuja suspeita é obtida por outros métodos (toque retal + antígeno específico da próstata total – PSA – e livre – PSAL) (Aefa tema 7, 2010).

O valor diagnóstico de um marcador tumoral depende da sua **sensibilidade**, diminuindo os falsos negativos, e da sua **especificidade**, reduzindo assim o número de falsos positivos. Atualmente, estão disponíveis no mercado diferentes sistemas de imunoanálise cujas enzimas ou compostos usados vieram substituir a perigosa manipulação dos marcadores radioisótopos, ao passo que, a utilização de anticorpos monoclonais, específicos para cada marcador, permitiu uma maior eficácia da dosagem, e portanto, um maior significado clínico.

Tendo noção da variedade de sistemas de imunoensaios existentes, é importante standardizar internacionalmente os testes, de forma a reduzir as diferenças nas dosagens entre equipamentos, como já acontece com a análise do PSA. Com base nesse facto, recomenda-se, para o seguimento de doentes oncológicos, a realização com ensaios idênticos em cada dosagem (Filella, 2010).

A diminuição do valor do marcador é indicativa de uma boa resposta, e portanto, de bom prognóstico; ao passo que um aumento do valor é significativo de uma recaída, doença residual ou metástases. No entanto, em ausência de cancro, pode observar-se uma concentração de um marcador tumoral acima do valor discriminante (*cut-off*), originando um falso positivo. Esse aumento pode ser causado por um défice na metabolização renal ou hepática dos biomarcadores, ou por inflamação ou necrose celular induzindo o aumento na produção dos marcadores tumorais (Filella, 2010).

Na tabela XI encontram-se os diferentes biomarcadores e suas aplicações na prática clínica. Contudo, os resultados não devem ser interpretados de maneira isolada, mas sempre com o contexto clínico.

Tabela XI: significado clínico dos biomarcadores tumorais (Filella, 2010; Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda.)

| Marcadores tumorais | Valores altos em situação: | | |
|---------------------|--|--|---------------------------|
| | maligna (carcinoma) | benigna | fisiológica |
| Antigénios | | | |
| CEA | -colorectal/ gástrico -mama -pulmão -adenocarcinoma | -doença de Crohn -insuficiência renal/ hepática -pneumopatia -fumador | |
| CA19.9 | -pâncreas -gástrico -pulmão | -insuficiência hepática -colestase -pancreatite -cirrose | |
| CA125 | -adenocarcinoma -ovário -pulmão | -insuficiência renal -endometriose -derrame pleural -ascite não maligna | -menstruação -gravidez |
| CA15.3 | -mama | -insuficiência renal -hepatopatia | |
| PSA* | -próstata | -manipulação da glândula prostática -Hipertrofia benigna da próstata (HBP) -prostatite aguda | |
| AFP | -células germinativas -fígado | -hepatite -cirrose | -gravidez |
| Hormonas | | | |
| Prolactina | -prolactinoma | | -gravidez |
| Tiroglobulina | -adenocarcinoma da tiróide | | |
| Calcitonina | -tiróide medular | | |

* No caso específico do PSA, quando o valor se encontra entre 4-10 ng/mL, é importante determinar também o PSA livre e consequentemente a razão FPSA/PSA. Tal ratio permite reduzir o número de biopsias desnecessárias, atendendo à percentagem obtida,

quanto mais baixo for o ratio (<10), maior a probabilidade, em percentagem, de estar perante um cancro da próstata, além disso, as percentagens aumentam com o avanço da idade.

b. Marcadores hormonais

A endocrinologia abrange o estudo das glândulas e das gónadas cuja tarefa principal é a produção e segregação de hormonas para a circulação sanguínea, A maioria das hormonas são proteínas, algumas são esteróides, e tem capacidade para aderir aos recetores membranares ou nucleares das células, de modo a regular a atividade de células noutras zonas do corpo.

A secreção hormonal é iniciada por um impulso neuronal que leva à produção, pelo hipotálamo, de pequenas hormonas peptídicas conhecidas como **hormonas inibidoras ou libertadoras**. Essas hormonas peptídicas atuam, de seguida, sobre a adenohipófise (glândula pituitária), de modo a segregar **hormonas tróficas**, que por sua vez vão estimular as glândulas endócrinas produzindo **hormonas secretoras**, diretamente libertadas para a corrente sanguínea (Henry, 1999).

Um mecanismo de *retroalimentação* permite regular as glândulas que estão sob controlo hipofisário como a tiróide, o córtex adrenal e as gónadas. Contudo, alguns fatores podem influenciar a sua secreção tais como o sono, as refeições, o sexo e a idade.

Os distúrbios endócrinos podem ser despistados mediante a medição das concentrações plasmáticas das hormonas produzidas pelas glândulas, que estão sob controlo da pituitária. Podemos assim encontrar anomalias no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (h.h.g) como:

- uma deficiência endócrina, denominada de **hipofunção**, que pode ter como origem a destruição da glândula por autoimunidade, cirurgia, infeção ou inflamação;

- um excesso endócrino, designado de **hiperfunção**, devido a um crescimento neoplásico de células endócrinas, na doença de Graves-Basedow (único distúrbio autoimune conhecido que causa hiperfunção) ou administração excessiva de hormonas. Geralmente são tumores benignos;

- uma **resistência hormonal**, correspondente a uma falha nos recetores geralmente causada por distúrbios genéticos, na qual são observados níveis elevados de hormonas.

É necessário estabelecer o diagnóstico correto para aplicar o tratamento eficaz, tais como a reposição hormonal na deficiência endócrina, a remoção cirúrgica dos tumores ou a diminuição dos níveis hormonais quando há excesso (Henry, 1999).

i. Distúrbios dos marcadores de fertilidade

Os marcadores de fertilidade utilizados na rotina jogam um papel determinante na fertilidade do homem e da mulher.

➤ A hormona luteinizante (**LH**) e a hormona folículoestimulante (**FSH**) são glicoproteínas, ambas hormonas gonadotróficas, que regulam dinamicamente o crescimento e o funcionamento das gónadas (ovários e testículos). Na mulher, o LH e o FSH estimulam o ovário de forma a favorecer o crescimento e amadurecimento do folículo, atingindo um pico de LH no momento de ovulação. No homem o LH estimula as células de Leydig, nos testículos, a fim de produzir testosterona, e o FSH induz o desenvolvimento dos espermatogónios. A determinação em conjunto de LH e FSH está indicada em doenças congénitas com anomalias cromossómicas (síndrome Turner), ovários poliquísticos, classificação de causas de amenorreia, síndrome *menopausa* e insuficiência Leydig (Roche e-LabDoc).

➤ A prolactina (**PRL**) é uma hormona trófica que atua sobre as glândulas mamárias, de forma a induzir o aleitamento após o parto. O seu aumento pode também originar azoospermia, amenorreia ou ciclos anovulatórios. Cerca de 60% dos adenomas da hipófise são prolactinomas (Roche e-LabDoc).

➤ O estradiol (**EII**) é uma hormona esteróide produzida maioritariamente pelos ovários, mas também em pequenas quantidades nos testículos e no córtex suprarrenal. Durante a gravidez, ele é sintetizado pela placenta. O EII controla o desenvolvimento das características secundárias femininas. Valores altos podem ter origem na superprodução de EII por tumores dos ovários/ ou testículos ou hiperplasia do córtex suprarrenal.













➤ A testosterona (**TEST**) é uma hormona androgénica responsável pela maturação dos órgãos genitais internos e pelo desenvolvimento das características secundárias masculinas.

➤ A progesterona (**PRG**) é uma hormona esteróide secretada pelo ovário, que prepara o revestimento do útero, facilitando a nidação do ovo fecundado.

➤ A hormona coriónica gonadotrófica (**hCG**) é uma glicoproteína sintetizada pelas células sincitiotrofoblásticas da placenta, permitindo a manutenção da gravidez. A sua

estrutura é semelhante às três hormonas hipofisárias LH, FSH e TSH, que são seus homólogos. Atendendo a que hCG não tem recetores específicos, quando se encontra em grandes concentrações, liga-se aos recetores de TSH e de LH, mimetizando os seus efeitos. Em tumores da placenta (molahidatiforme, coriocarcinoma), os valores aumentados podem ser confundidos com gravidez. As alterações dos marcadores da fertilidade encontram-se agrupadas na tabela XII (Henry, 1999).

Tabela XII: diferentes alterações da fertilidade (Henry, 1999)

| Alterações da fertilidade | Determinações analíticas | Causas/ doença associada |
|---|--|---|
| Disfunção ovário | FSH e LH  , EII  | -Função ovárica alterada |
| Amenorreia com PRL normal | FSH, LH e EII  | -Folículos não estimulados |
| Prolactinoma | PRL   inibe FSH,LH e EII  | -Tumor na hipófise |
| Hiperandrogenia | TEST e DHEA-s  (na mulher) | -Síndrome ovário poliquístico -Tumor ovário ou suprarrenal (hirsutismo) -Deficit 21-OH-ase (HAC) -Secreção ectópica de hCG |
| | TEST, DHEA-s e LH  (no homem) | -Tumor das células de Leydig -Deficit 21-OH-ase (HAC) -Secreção ectópica de hCG |
| Hipogonadismo 1ºário (hipogonadismo hipergonadotrófico) | FSH e LH  e EII /ou TEST  (mulher/ ou homem) | Disfunção nas gónadas: -Klinefelter (47XXY) -Síndrome de Turner (45 X) |
| Hipogonadismo 2ºário,3ºário (hipogonadismo hipogonadotrófico) | LH, FSH e EII /ou TEST  (mulher/ ou homem) | Disfunção no eixo h.h.g: -Síndrome de Kalmann - <i>Dwarfism</i> |
| Azoospermia | PRL  inibe FSH | -Espermatogénese deficiente |

Na mulher em idade fértil, as hormonas da fertilidade seguem um determinado padrão. Inicialmente é observado a fase folicular, que corre durante os 14 dias imediatos à menstruação, período em que amadurece o folículo. Segue-se então a ovulação, marcada por um pico de LH, que ocorre ao meio do ciclo. Finalmente, na fase luteínica, surge um aumento da concentração de PRG, que é o produto de segregação do corpo lúteo (figura 11). Na mulher em fase climatério (pré-menopausa) o padrão muda: temos FSH alto e EII baixo, como consequência da redução dos folículos disponíveis e ciclos irregulares. Quando a mulher está, pelo menos, um ano sem menstruar, considera-se que entrou na menopausa,

fase que se caracteriza por FSH muito alto, LH alto e EII baixo. Nesse caso, não há folículos disponíveis, nem há ciclos.

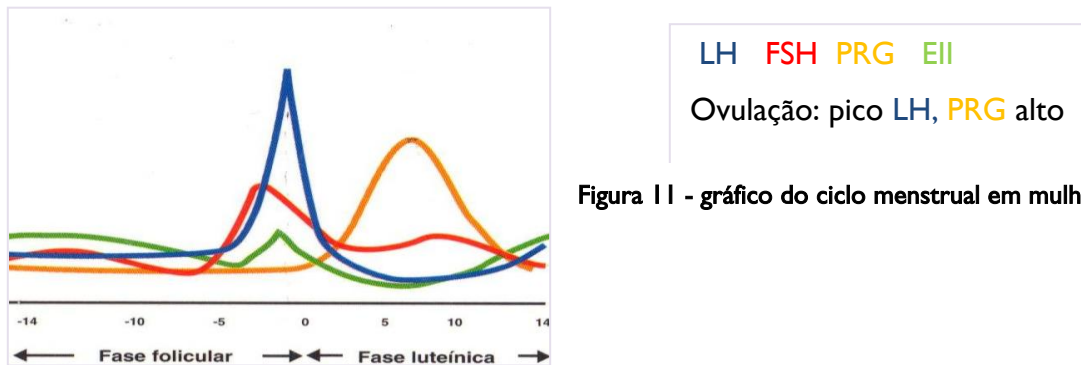


Figura 11 - gráfico do ciclo menstrual em mulher fértil

ii. Distúrbios dos marcadores da tiróide

A glândula da tiróide produz duas hormonas: a tiroxina e a triiodotironina, que exercem um papel importante na diferenciação celular e ajudam a manter o equilíbrio termogénico e metabólico no adulto.

A tiroxina (**T4**), principal hormona da tiróide, é secretada na totalidade pela glândula. Na sua grande maioria, circula ligada a proteínas transportadoras, tais como a *Thyroxin Binding Globulin* (TBG), a albumina e a pré albumina ([Roche e-LabDoc](#)).

- A triiodotironina (**T3**), 20% é secretada pela glândula e os restantes 80% provêm da desionidação periférica de T4 em T3 no rim como no fígado. T3 é a forma metabolicamente ativa, comparando com a T4 (Bounaud et al, 1999).
- A tirotropina (**TSH**) é uma glicoproteína sintetizada pela hipófise, com capacidade para estimular a proteólise da tiroglobulina e regular a secreção hormonal da glândula da tiróide. É um dos principais marcadores, em conjunto com a FT4, para a monitorização da terapêutica tirossupressora (Bounaud et al, 1999).
- A tiroglobulina (**TG**) é uma proteína sintetizada pelos tirócitos e transportada para os folículos. Qualquer lesão na parede dos folículos pode levar a um aumento de TG no sangue. Esse facto permite ainda monitorizar uma tirectomia total, sendo certo que, é bem sucedida quando o seu valor é indetetável no sangue. A iodinação de alguns dos resíduos de tirosina que compõem a TG e o acoplamento químico de mono e bi-iodotirosina estão sob a intervenção da enzima tiroperoxidase (TPO), com intuito de sintetizar as hormonas T3 e T4.

➤ A triiodotironina livre (FT3) e a tiroxina livre (FT4), são as frações hormonais que circulam livremente, pelo que as suas concentrações não dependem das alterações nas proteínas transportadoras, permitindo assim a determinação mais correta do doseamento de T3 e T4, respetivamente, para a exploração da tiróide. Constituem, de igual modo, as hormonas biologicamente ativas, visto que estão imediatamente disponíveis para penetrar na célula (Bounaud et al, 1999).

Para o despiste de doenças de causa auto imune, como a tiroidite de Hashimoto e a doença de Graves-Basedow, é relevante determinar os anticorpos anti-tiroglobulina (A-TG) e os anticorpos anti peroxidase (A-TPO), sendo certo que a TG e a TPO são potentes autoantigénios (Roche e-LabDoc).

Os distúrbios podem ter como origem um processo autoimune, levando a uma produção excessiva das hormonas da tiróide (tirotoxicose), ou a uma destruição da glândula, acarretando uma produção deficiente das mesmas (ver tabela XIII).

Tabela XIII: distúrbios dos marcadores da tiróide (Henry, 1999)

| Distúrbio | Alterações dos testes de triagem | Causas/ doenças |
|---|----------------------------------|--|
| hipotiroidismo | | |
| Primário (lesão da glândula) | TSH ↑, T3 e T4 ↓ | -Hiperplasia dos folículos (bócio) 95% dos casos são autoimune |
| Secundário (lesão da hipófise) | TSH ↓, T3 e T4 ↓ | -Défice de hormona hipofisária TSH |
| Terciário (lesão do hipotálamo) | TSH ↓, T3 e T4 ↓ | -Défice de hormona hipotalâmica TRH(h. libertadora da tirotrófina) |
| Congénito | TSH ↑, FT4 ↓ | -Défice enzima para captação de iodo -Terapêutica (iodo, fármacos anti tiroideus na gravidez) |
| Adquirido | TSH ↑, T3 e T4 ↓ | -Aporte deficiente de iodo (tiroidite de Hashimoto) -Tratamento do hipertiroidismo -Destruição da tiróide (cirurgia) -Dieta (mandioca) -Terapêutica (lítio, amiodarona) |
| hipertiroidismo | | |
| Primário (lesão da glândula) | TSH ↓, FT4 e Trab ↑ | -Doença de Graves-Basedow |
| | TSH ↓, T3, T4 e FT4 ↑ | -Doença de Plummer -Tumores malignos (raros) |
| Secundário (lesão da hipófise) | TSH ↑, T3 e T4 ↑ | -Tumor trofoblástico (GC-TSH) -Adenoma da hipófise secretora de TSH (raro) |

c. Marcadores de infecciosa

i. Marcadores de hepatite

A hepatite é uma inflamação do fígado, que pode ser originada por vírus, bactérias, drogas, ingestão de álcool, etc. Geralmente, no ambulatório, são estudadas maioritariamente as hepatites provocadas pelos vírus A, B e C, sendo certo que são essas hepatites virais que teem maior impacto na morbidade da população mundial. Existem outros tipos de vírus que agem em situações específicas como o vírus E em zonas endémicas, o vírus D que origina coinfeção ou superinfecção com o vírus B, piorando as características clinicas do doente e o vírus G que possui uma certa homologia com o vírus C, sem agravar o curso clínico da hepatite B ou C. É do nosso conhecimento que os vírus teem períodos de incubação diferentes e que em muitos casos não apresentam sintomas, situações que ocorrem geralmente nos portadores crónicos. Por tal razão, é necessário recorrer aos marcadores para o despiste de hepatite viral, de forma a limitar a propagação do vírus através de adequada prevenção. A monitorização é igualmente de grande utilidade porque permite aumentar a esperança de vida em doentes portadores, cujo decurso da doença termina geralmente em cirrose ou carcinoma do fígado. O estudo comparativo das hepatites A, B e C, representado na tabela XIV, permite observar algumas diferenças e similaridades quanto à transmissão, cronicidade, prevenção, etc. (<http://www.roche.pt/hepatites/>)

Tabela XIV: estudo comparativo das hepatites A, B e C (vírus da família Picornaviridae) (Lefrere et al, 1998)

| | Hepatite A | Hepatite B | Hepatite C |
|---------------------------|--|---|---|
| Transmissão | -entérica (alimentos e bebidas contaminadas) | -sexual -parenteral -perinatal -contacto direto | -parenteral -nosocomial |
| Probabilidade cura | 100% dos casos | -90 a 95% nos adultos -50% nas crianças -5 % nos recém nascidos | -20% dos casos |
| Complicações | -forma fulminante (rara) | -cirrose -carcinoma hepatocelular | -cirrose -carcinoma hepatocelular |
| Cronicidade | Não | Sim (5% casos no adulto) | Sim (80% dos casos) |
| Prevenção | -vacinação -regras de higiene -imunoglobulinas | -vacinação -imunoglobulinas | -regras de higiene -não há vacinas |
| Indivíduo de risco | -viajante (zona endémica) -pessoal saúde -instituições | -toxicómanos -hemodialisados -crianças de mãe portadora | -toxicómanos -pessoal de saúde -hemodialisados ou imunodeprimidos |

➤ Vírus da Hepatite A (HAV)

O HAV possui um único sistema antigénico, permitindo assim a diferenciação entre uma infeção aguda ou passada através da deteção dos respetivos anticorpos heterogéneos anti-HAV-IgG e IgM. Durante a fase aguda da doença, na qual aparecem sintomas como a icterícia, o primeiro anticorpo a ser detetado é o anti-HAV classe IgM. Passado algumas semanas após o contágio, aparece então o anticorpo classe IgG, que confere imunidade ao paciente para toda a vida. A evolução da doença pode ser diagnosticada pela deteção desses anticorpos (Miller et al, 1999).

- : Negativo + : Positivo

Tabela XV: interpretação dos anticorpos no HAV

| Ac. Anti-HAV Totais IgG | Anti-HAV Ig M | Interpretação |
|-------------------------|---------------|---------------------------------------|
| - | - | Ausência de infeção recente/Não imune |
| - | + | Infeção aguda |
| + | + | Infeção aguda resolvida |
| + | - | Cura /Imune |

➤ Vírus da Hepatite B (HBV)

No HBV, são encontrados três sistemas antigénicos. O primeiro antigénio, corresponde ao da superfície ou *envelope* viral (AgHBs), o segundo é um antigénio específico do núcleo central *core*, constituindo a cápside (AgHBc) e o terceiro é outro antigénio também ligado ao núcleo (agHBe). Os anticorpos que lhes correspondem são, respetivamente: o anti-HBs, o anti-HBc e o anti-HBe (Miller et al, 1999).

O aparecimento e desaparecimento cronológico dos antigénios – Ag – e anticorpos – Ac – permitem seguir a evolução da doença (figura 12). É com base nesse conhecimento, que se baseia a interpretação dos resultados (tabela XVI).

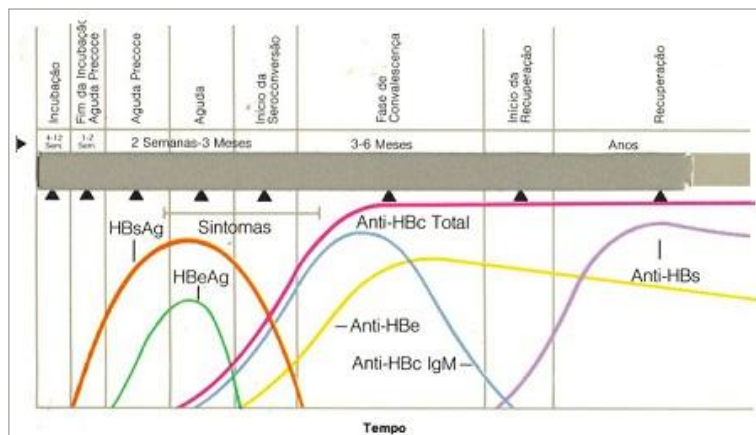


Figura 12 - evolução serológica dos marcadores de hepatite B

Tabela XVI: interpretação dos marcadores de hepatite B (Huraux et al, 1985)

| Marcadores serológicos de HBV | | | | | Interpretação |
|-------------------------------|-------|----------|----------|----------|--|
| AgHBs | AgHBe | Anti-HBe | Anti-HBc | Anti-HBs | |
| - | - | - | - | - | Não imune |
| + | + | - | - | - | Início da fase aguda ^{a)} |
| + | + | - | + | - | Hepatite aguda ou portador crónico* ^{a)} |
| + | - | + | + | - | Infeção recente ou portador crónico* ^{a)} |
| - | - | - | + | - | Infeção recente c/ AgHBs não detetável * ou infeção antiga c/ anti-HBs não detetável |
| - | - | + | + | + | Convalescença de uma hepatite aguda |
| - | - | - | + | + | Doente curado |
| - | - | - | - | + | Imunidade antiga ou pós vacinação |

* A evidência de uma taxa elevada de anti-HBc classe IgM permite diagnosticar a fase aguda

^{a)} Contagioso

É de referir que a persistência do AgHBs durante mais de seis meses demonstra o caráter crónico da infeção pelo HBV, assim como a presença do AgHBe revela um nível aumentado de replicação viral, enquanto o anti-HBe define um baixo nível (Huraux et al, 1985).

➤ Vírus da Hepatite C (HCV)

O aparecimento do anticorpo anti-HCV pode demorar cerca de oito semanas após o contágio. Geralmente o HCV é assintomático ou com sintomas ligeiros como a fadiga, pelo que é considerado uma epidemia *silenciosa*. Também é conhecido como a principal causa de doença hepática crónica tais como a cirrose e o carcinoma hepatocelular.

O seu rastreio é feito na gravidez, em pessoas consideradas de risco e em doentes com manifestações clínicas de doença de fígado de causa desconhecida. Se os Ac Anti-HCV estão presentes, a replicação viral ativa é confirmada pela presença de ARN HCV enquanto que, em pacientes hemodialisados ou imunodeprimidos os Ac anti-HCV estão ausentes. Nesse caso a presença de ARN viral permite confirmar o diagnóstico da hepatite C crónica (Lefrere et al, 1998).

ii. Marcador do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)

O VIH pertence à família Retroviridae. É considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a sexta causa, com maior prevalência no mundo, no que respeita à mortalidade. Inicialmente, só alguns grupos de indivíduos foram expostos, tais como os

homossexuais e os toxicómanos. Nos anos 80, foi descoberto nos hemofílicos tratados e em alguns doentes politransfundidos. Por consequência, passou a existir um rastreamento em bancos de sangue, onde são efetuados testes para vários tipos de vírus, transmissíveis de forma parenteral (Prado Cintra et al, 1997).

A replicação do VIH é feita através da sua ligação com qualquer célula ativada que apresente recetores CD4, apesar de ocorrer preferencialmente a nível dos órgãos linfoides periféricos. Quando um indivíduo tem a contagem e a eficácia dos linfócitos T CD4 bastante diminuída ($<200\text{CD4}/\text{mm}^3$ ou $<15\%$ dos linfócitos totais – valores de referência: $600\text{-}1200\text{CD4}/\text{mm}^3$ ou 40% dos linfócitos totais) (AIDSportugal), a frequência e a gravidade das infeções oportunistas aumentam e estamos perante uma imunodeficiência clínica: a SIDA (Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida) (Prado Cintra et al, 1997).

Na tabela XVII encontram-se esquematizadas as principais características associadas ao VIH.

Tabela XVII: Estudo do VIH

| | VIH |
|---------------------------|--|
| Transmissão | -sexual (+++) –parenteral –vertical (gravidez, parto, aleitamento) |
| Sinais clínicos | - <u>infeção aguda</u> (período incubação): Síndrome mononucleosido, tipo gripal - <u>fase de latência clínica</u> : assintomática mas com replicação viral ativa - <u>fase sintomática SIDA</u> : alterações neurológicas, dermatológicas, etc. |
| Complicações | -Sarcoma de Kaposi -infeções por germes oportunistas (<i>P.carinii</i> , <i>C.neoformans</i> , <i>T.gondii</i> , CMV, HSV, <i>Cryptosporidium</i> , <i>C.albicans</i> , <i>M.avium</i>) |
| Prevenção | -educação sobre as formas de transmissão -profilaxia pós exposição -terapia HAART (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>) |
| Indivíduo de risco | -homossexuais –toxicómanos -indivíduos expostos a produtos contaminados (pelas vias de transmissão) |

O método de diagnóstico da infeção pelo VIH é, preferencialmente, um teste de rastreio pela técnica ELISA, onde se detetam de forma combinada os anticorpos anti-VIH1, anti- VIH2 e o antigénio p24 do VIH1. Este último veio reduzir o tempo de deteção da infeção, após contaminação, em cerca de três semanas, período no qual aparece somente o antigénio p24. Qualquer resultado positivo, obtido por esse teste de rastreio, impõe a sua confirmação por um método com maior especificidade para as proteínas do VIH: *Western Blot* (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda).

iii. Serologia infecciosa

Nesta parte, estão incluídas as doenças infecciosas e parasitárias que geralmente têm um curso benigno em pessoas imunocompetentes mas que, em contrapartida, geram complicações na grávida, como a infeção congénita que atinge o feto, e em pessoas imunodeprimidas incluindo o transplantado, o doente de SIDA, o doente de cancro, etc. Por conseguinte, é importante o seguimento serológico de doenças infecciosas, tais como a Toxoplasmose, a Rubéola e o Citomegalovírus, em indivíduos pertencentes a esses grupos de risco e em mulheres em idade fértil. Para ajudar no diagnóstico, a quantificação das imunoglobulinas específicas IgG e IgM e a interpretação das mesmas revelam-se vitais, sendo certo que, numa resposta primária predominam os anticorpos de classe IgM, ao passo que na resposta secundária os mais reativos são os anticorpos de classe IgG.

Na mulher grávida, a contração de uma primoinfeção ao longo da gravidez pode implicar malformações do feto. Nesse caso, a determinação da data de contaminação é útil porque a severidade do atingimento fetal bem como o risco de transmissão ao feto dependem da idade de gestação em que se deu a contaminação materna, sendo as malformações mais graves no primeiro trimestre de gravidez (Prado Cintra et al, 1997).

Para permitir a diferenciação de uma infeção antiga de uma recente, recomenda-se então a realização de testes serológicos num intervalo de tempo de duas a três semanas a fim de seguir a evolução do título de anticorpos IgG e IgM. Quando existe seroconversão, ou seja positividade para IgG e para IgM, a determinação da avididade das IgG, com um índice de avididade elevado, permite excluir uma primoinfeção recente e indica a presença de IgM residuais (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda).

No recém-nascido, a deteção dos anticorpos IgM é mais significativa porque a IgM não atravessa a barreira placentária como o anticorpo materno transferido, sendo indicativo de uma infeção congénita (Prado Cintra et al, 1997).

As possíveis vias de transmissão para a toxoplasmose, a rubéola e o citomegalovírus, estão enumeradas na tabela XVIII, sendo certo que, a transmissão vertical é comum às três.

Tabela XVIII: Transmissão possível das diferentes doenças infecciosas

| | Toxoplasmose | Rubéola | Citomegalovírus |
|-------------|---|---|--|
| Transmissão | -vertical -quistos na carne mal cozinhada -ooquistos no legume mal lavado | -vertical -gotículas de saliva -secreções nasofaríngeas | -vertical -perinatal -contacto c/liq. biológicos contaminados (urina, saliva, sémen, sangue, sec.vaginais) -transplante de órgãos -transfusões (raro) |

➤ **Toxoplasmose**

A toxoplasmose é uma parasitose provocada pelo protozoário *toxoplasma gondii*, parasita oportunista em grávidas e em pacientes imunodeprimidos.

Na maioria dos recém-nascidos, a infecção congénita é assintomática mas em crianças não tratadas pode desenvolver-se manifestações tardias entre as quais as corioretinites e os problemas neurológicos durante a infância. Se a infecção ocorrer no primeiro trimestre da gravidez, gera-se um quadro agudo que termina com a morte do feto ou num atraso físico mental profundo do recém-nascido (Prado Cintra et al, 1997).

Em pacientes imunodeprimidos, a parasitose resulta da reativação de uma infecção crónica – latente. Por consequência, pode ocorrer em doentes com Sida toxoplasmose cerebral ou encefalite toxoplasmática. No doente transplantado, é importante conhecer a imunidade à toxoplasmose em relação ao dador e ao recetor a fim de evitar a reativação de quistos transplantados que levam à aparição de sintomas neurológicos ou encefalopatia difusa. A situação ideal, nesse caso, seria obter um dador não imune à toxoplasmose assim como o recetor.

➤ **Rubéola**

O vírus da rubéola pertence à família Togaviridae. A gravidade da doença é conhecida principalmente pela infecção congénita que ocorre na gravidez.

Em 1964, uma grande epidemia atingiu os Estados Unidos, levando a malformações em recém-nascidos de mães que contraíram a doença no primeiro trimestre. Desde então, disponibilizaram-se testes serológicos que permitiram despistar as mulheres não imunes e vaciná-las, a fim de prevenir qualquer risco de rubéola congénita numa gravidez futura (Huraux et al, 1985; Prado Cintra et al, 1997).

As malformações atingem particularmente o coração, o ouvido interno e o olho. Para além disso verifica-se baixo peso do recém-nascido relacionado com um atraso de crescimento intrauterino, hépato e esplenomegalia, púrpura trombocitopénica, atraso mental, etc. (Prado Cintra et al, 1997).

➤ **Citomegalovírus**

O CVM pertence à família Herpesviridae. Nos países desenvolvidos, 60-85 % dos adultos estão infetados, pelo que as grávidas e os indivíduos imunodeprimidos estão mais sujeitos à infecção por esse vírus. Contrariamente ao que acontece na toxoplasmose e na

rubéola, um indivíduo que teve uma infecção primária pode ser reinfectado por outra estirpe, porque não adquiriu imunidade após o primeiro contágio.

No caso da grávida, a situação mais grave é a primo infecção, na qual o feto desenvolve **infecção congénita**, geralmente assintomática e com manifestações tardias (atraso mental, surdez, alterações oculares). Menos comum é a doença das inclusões citomegálicas no recém-nascido, usualmente sintomática. De igual modo, pode surgir **infecção perinatal**, mais vulgar que a infecção congénita, onde geralmente ocorre pneumonia intersticial (Prado Cintra et al, 1997).

A **infecção pós-natal** induzida pelo vírus, atinge principalmente as crianças em creches e os jovens que iniciam a sua vida sexual. A grande maioria das pessoas imunocompetentes não tem sintomas quando em contacto com o vírus, as restantes teem uma síndrome mononucleósica que decorre cerca de 2 a 6 semanas. O quadro agrava-se mais para os imunodeprimidos que podem desenvolver, para além da síndrome mononucleósica, hepatite, infecção renal, retinite, etc. (Prado Cintra et al, 1997).

No caso específico dos transplantados, é necessário recorrer ao diagnóstico precoce e ao tratamento anti-vírico porque o CMV é conhecido como uma causa importante na morbidade e na mortalidade dos transplantes de órgãos (Prado Cintra et al, 1997).

➤ Interpretação na serologia infecciosa

Tabela XIX: interpretação do seguimento serológico da Toxoplasmose, Rubéola e CMV

| IgG | IgM | Interpretação |
|-----|-----|--|
| - | - | Não imune. Aconselha-se seguimento serológico mensal. |
| - | + | Primo infecção ou presença de IgM não específicos (confirmar na 2ª colheita após 3 semanas, o aparecimento ou não de IgG). |
| + | + | Primo infecção. Aconselha-se a medida da avidéz das IgG. |
| + | - | Infeção antiga que confere imunidade * (se IgG estáveis na 2ª colheita), senão reativação ou primo infecção sem IgM: medir a avidéz das IgG. |

* No caso específico do CMV é dito “perfil serológico, sugestivo de infecção passada”

d. Marcadores de anemia

Por existirem várias formas de anemias, com origem etiológica diferente, é necessário requerer diagnóstico para idealizar o tratamento adequado. Na grande maioria, as anemias estão associadas a deficiências de vitaminas ou ferro, que são originadas num défice de absorção, desnutrição, ou ainda necessidades aumentadas do organismo (ver em

diminuição da massa eritrocitária). Os ensaios disponíveis, para proteínas como a ferritina e as vitaminas envolvidas no metabolismo como a B₁₂ e o ácido fólico, são bons indicadores da função metabólica e nutricional adequadas.

➤ **Vitamina B₁₂**

A Vitamina B₁₂ está presente em alimentos como a carne. A anemia induzida pela sua deficiência, essencialmente provocada por um defeito na absorção, só acontece após esgotamento das grandes reservas armazenadas no fígado, ou seja após 2 a 4 anos (Merck Sharp & Dome, vol.10).

Geralmente o diagnóstico da anemia perniciosa é feito através da observação de eritrócitos macrocíticos e de níveis séricos da vitamina inferiores ao limite de referência. Porém, podem ser pesquisados os autoanticorpos dirigidos contra o fator intrínseco, permitindo diferenciar a anemia perniciosa de outras doenças relacionadas com deficiência de vitamina B₁₂ ou mal absorção. Os anticorpos anti-fator intrínseco (ac. Anti-FI) são mais específicos para o diagnóstico de anemia perniciosa enquanto os anticorpos anti-célula parietal (APCA) aparecem em pacientes com gastrite autoimune (http://germanodesousa.com/media/uploads/homepage/large/pdf/Germano_AnemiaPerniciosa.pdf).

Em sumo, a deficiência da vitamina causa degenerescência irreversível do sistema nervoso central, pelo que é vital detetar a deficiência em vitamina B₁₂, assim como a origem etiológica da doença, de forma a tratar corretamente o doente.

➤ **Ácido fólico**

Os vegetais de folhas verdes cruas, fruta fresca, fígado e outras vísceras são as fontes principais da vitamina ácido fólico, contudo, a cocção destrói-o.

Contrariamente à vitamina B₁₂, o organismo armazena somente uma pequena quantidade no fígado. Por conseguinte, a sua deficiência é sentida em poucos meses e o seu défice é mais vulgar porque a ingestão de verduras cruas é geralmente insuficiente (Merck Sharp & Dome, vol.10).

As pessoas mais suscetíveis à deficiência são: crianças, grávidas, alcoólicos e pessoas desnutridas. A anemia megaloblástica, gerada pela carência de folato, deve ser vista com mais atenção nas crianças, pois existem outras doenças tais como leucemias, anemia aplástica, anemia hemolítica ou constitucional cujo sinal mais precoce é a anemia macrocítica (Miller et al, 1999).

Embora o défice de folato não cause distúrbios neurológicos no adulto, nas grávidas pode levar a defeito do tubo neural no feto.

➤ **Ferritina**

É uma glicoproteína ferruginosa existente principalmente, nos órgãos de armazenamento (fígado, baço e medula óssea). A ferritina é considerada um indicador sensível para a deficiência do ferro, visto que a sua concentração é proporcional às reservas do mesmo. Muito antes da concentração de hemoglobina e dos níveis de ferro baixarem para um nível considerado anêmico, a concentração sérica de ferritina encontra-se num valor limite inferior, pelo que é considerado um parâmetro útil na detecção de uma deficiência de armazenamento no sistema reticuloendotelial numa fase muito inicial (Roche e-LabDoc). Quando surge sobrecarga de ferro no organismo, como acontece na hemocromatose idiopática ou na talassémia maior (Henry, 1999), é possível evidenciá-la por concentrações elevadas de ferritina, superiores ao valor limite de referência. Porém, os valores podem estar aumentados em alguns distúrbios crónicos como a inflamação, a infeção e nalgumas neoplasias (leucemia aguda, doença de Hodgkin, carcinoma do pulmão, do cólon, do fígado e da próstata). Também é bom referir a importância da ferritina como marcador tumoral nas metástases do fígado, sendo uma grande ajuda na monitorização e no seguimento da doença após tratamento (Roche e-LabDoc).

e. Marcadores de alergia

As reações alérgicas que envolvem as imunoglobulinas de classe E – IgE, foram associadas à denominada hipersensibilidade de tipo I ou imediata.

As reações adversas de uma resposta do sistema imunitário, à presença de um antígeno, são devidas às substâncias químicas libertadas pelas células ligadas à imunoglobulina E, que acabam por lesar os tecidos envolventes. A reação alérgica pode ser uma simples manifestação anafilática localizada provocando asma alérgica, rinite alérgica, conjuntivite alérgica ou urticária; ou ao contrário uma manifestação anafilática sistémica, ocasionando sequencialmente vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição seguida de asfixia, e finalmente choque anafilático, que pode levar à morte do indivíduo (Merck Sharp & Dome, vol.10).

A extensa variedade de alérgenos existentes levou à necessidade de desenvolver testes específicos *in vitro* com o intuito de obter um diagnóstico precoce e melhorar o tratamento (Merck Sharp & Dome, vol.10).

➤ **IgE**

A IgE é um teste alergénico não específico que, como já foi referido anteriormente, aparece nas reações alérgicas. Contudo pode estar aumentado em afeções não alérgicas tais como por exemplo: parasitoses, nefropatias, défices imunitários e doença de Hodgkin (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda.).

➤ **Stallergy (ST)**

Contrariamente ao IgE, o ST é um teste específico de alergénio. Os alérgenos mais comuns são: proteínas (vacina), polens (gramíneas), drogas (penicilina, salicilatos), alimentos (frutos do mar, ovo, leite, nozes), produtos de inseto (abelha, aranha, ácaros), pelo de animais, látex, etc. (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda.)

3. Técnicas manuais

a. Rapid Plasma Reagin (RPR)

O espiroqueta *Treponema pallidum*, agente etiológico da sífilis, induz a produção de dois tipos de anticorpos na infeção humana: anticorpos anti antigénios lipídicos não treponémicos (reagina), que são a base dos testes de screening (Venerean Disease Research Laboratory – VDRL – ou RPR) e anticorpos que reagem com antigénios treponémicos, que são usados nos testes confirmatórios (Fluorescent Treponemal Antibody Absortion – FTA-ABS, Treponema Pallidum Hemagglutination – TPHA).

A deteção das reaginas é possível por floculação do reagente RPR (antigénio VDRL clássico, modificado com carvão) e do anticorpo. Quando o teste da reagina se encontra positivo recomenda-se a realização de testes confirmatórios para descartar a hipótese de falsos positivos. Tais situações ocorrem na mononucleose infecciosa, lúpus eritematoso, malária, pneumonia viral e administração de vacinas (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda.).

b. Paul-Bunnel

A mononucleose infecciosa (MNI) traduz-se por um distúrbio linfoproliferativo sistémico, provocada pelo vírus de Epstein Barr (EBV), que pertence à família Herpesviridae.

Nas crianças até aos cinco anos, a doença é maioritariamente assintomática, ao passo que nos adolescentes e adultos aparecem sintomas pouco específicos tais como febre, faringite, adenopatia, etc.

A técnica de rastreio da MNI baseia-se na pesquisa dos anticorpos heterófilos associados à doença. A capacidade desses anticorpos reagirem com eritrócitos de diferentes espécies (cavalo, boi, rim de cobaia) é colocada em evidência no teste de Hoff-Bauer e no teste de absorção diferencial de Davidshon, permitindo assim diferenciar os anticorpos de tipo Forssman dos anticorpos heterófilos. Porém, a deteção dos anticorpos heterófilos é negativa em 20 a 30 % das primoinfeções à EBV. Nesse caso, quando existe suspeita de infeção, devem ser pesquisados os anticorpos específicos anti-EBV (ac.IgM EBV-VCA) que aparecem em 100% das infeções primárias (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda.).

c. Antígenos febris

As salmonelas, brucelas e riquetsias são microrganismos causadores de infeções, que induzem uma resposta imunológica por parte do hospedeiro infetado. É possível a deteção de anticorpos produzidos por essas bactérias recorrendo a antígenos febris, contidos em suspensões bacterianas inativadas.

Sintomatologias tais como febre intermitente, persistente, suores, fraqueza e a eventual história clínica do doente sugerem ao clínico a necessidade de despiste de qualquer uma dessas doenças infecciosas. Para esse efeito, existem os seguintes testes:

➤ **Reação de Widal – antígenos TO, TH, AO, AH, BO, BH**

É utilizada para o diagnóstico da febre tifoide e paratifoide (A e B). O uso concomitante de antígeno O *somático* e antígeno H *flagelar* aumenta o valor diagnóstico, sendo certo que, o antígeno O confirma a presença de infeção ativa (8º dia após contaminação) ao passo que o antígeno H aparece mais tarde (10-12 dias) e persiste durante muito mais tempo, sugerindo infeção passada. Por conseguinte, recomenda-se a determinação da prova serológica, com intervalos quinzenais, de modo a verificar a evolução da doença. Aumentos superiores a duas vezes o título anterior, títulos superiores ou iguais a 1/160 em regiões não endémicas ou superiores ou iguais a 1/320 em profissionais de alto risco (talhantes, veterinários) sugerem infeção aguda (Miller, 1999). De igual modo, aconselha-se a realização de uma hemocultura durante a primeira semana da doença.

O contágio dá-se pelos alimentos e águas contaminadas com fezes humanas, embora possa haver transmissão de pessoa para pessoa.

➤ **Reação de Weil-Felix – antígenos OX19, OX2, OXK**

Esta prova é utilizada para o diagnóstico da *febre da carrapa* (*R.conorii*) e do *tifo* (*R.prowazekii* ou *R.typhi*), embora não seja específica de riquetsiose. A similaridade entre os antígenos O existentes nas paredes celulares das riquetsias e em certas estirpes de *Proteus* permitiu o uso de antígenos febris, baseando-se em três estirpes de *Proteus*. Assim sendo, em todos os resultados considerados positivos, deve-se despistar uma eventual infecção urinária por *Proteus*. A positividade do título encontra-se então mais elevada, ou seja, superior ou igual a 1/160 (Miller, 1999).

➤ **Reação de Wright**

Existem três espécies de brucela que atingem o ser humano. A *Brucella melitensis* é a espécie que causa mais casos de brucelose em todo o mundo, sendo certo que, provêm de caprinos e ovinos contaminados. A *Brucella abortus* está presente em bovinos infetados, causando também doença nos animais (doença *de bang*), e a *Brucella suis* encontra-se em porcos contaminados (Prado Cintra et al, 1997). O contágio pode acontecer diretamente por contacto com o animal infetado ou indiretamente por ingestão de produtos lácteos não pasteurizados.

O despiste é fundamental porque estas bactérias têm um tropismo pelo sistema reticuloendotelial, o trato reprodutivo e as articulações, podendo aí causar graves lesões. A positividade do título adotado, como sugestivo de brucelose, é igual ou superior a 1/160 (Prado Cintra et al, 1997).

d. Waaler-Rose

É um teste usado para a deteção dos fatores reumatóides (FR) de classe IgM, que são encontrados em doenças reumáticas tais como a poliartrite reumatoide, embora possam estar presentes tanto em pessoas sãs como em pessoas com outras doenças. Os FR, quando estão presentes no soro do doente, aglutinam os glóbulos vermelhos de carneiro, cobertos com IgG de coelho, originando um resultado positivo. Nesse caso, é aconselhável a semi-quantificação dos FR, por outro método, permitindo assim avaliar os seus níveis séricos (Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - Biomérieux Portugal, Lda.).

e. Anticorpos antinucleares (ANA) – ImmunoDOT™

As doenças reumáticas caracterizam-se pela presença de um ou mais autoanticorpos, dirigidos contra os componentes da superfície celular, do citoplasma, ou ainda do núcleo das células. Geralmente apresentam uma predisposição genética, se bem que, alguns fatores tais como infecções virais, drogas ou ambiente, podem contribuir para o desencadear de tal situação (Henry, 1999).

O imunoensaio ImmunoDOT™ permite diagnosticar, precocemente, doenças autoimunes tais como o Lupus eritematoso sistêmico (SLE), a síndrome de Sjögren (SS) e as doenças mistas do tecido conectivo (MCTD).

O **SLE** caracteriza-se por uma lesão tecidual, em órgão não específico, incluindo um vasto espectro de autoanticorpos dirigidos contra os antígenos dsDNA, Smith-Sm, SSA//Ro, SSB/La ou ribonucleoproteína-RNP, sendo certo que, os mais específicos são os dois primeiros. A **SS** caracteriza-se por uma infiltração linfocítica das glândulas lacrimais e salivares, que induz secura dos olhos e da boca. Os anticorpos encontrados são anti-SSA e anti-SSB. Observe, na tabela XX, os anticorpos envolvidos nessas doenças.

Tabela XX: frequência de autoanticorpos presentes em doenças reumáticas como SLE, SS e MCTD

| | dsDNA | Ag-Smith | SSA | SSB | RNP |
|-------------|-----------|----------|--------|------|----------|
| SLE | >50-60% * | 30% * | 30-40% | 15% | 30-40% |
| SS | - | - | >70% | >60% | - |
| MCTD | - | - | - | - | >90-100% |

* autoanticorpos mais específicos para SLE

Capítulo 4 - Sistema de Gestão da Qualidade

Os critérios de qualidade no laboratório primam pelo rigor das melhores práticas laboratoriais, usando diversas ferramentas tais como os manuais de procedimentos, programas de manutenção, Controlo de Qualidade Interna (CQI) e programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) (Cooper, 2008).

Num contexto de uma melhoria contínua e de acordo com as normas NP EN ISO 9001/2000, das normas para o Laboratório Clínico da Ordem dos Farmacêuticos e do manual de Boas Práticas Laboratoriais, foi elaborado um programa informático, denominado, **Infoqual 2005**, que se revelou um elemento chave na certificação do laboratório Virgílio Roldão. O programa incluiu o Manual da Qualidade, os Procedimentos Gerais de Organização (PGO), os Procedimentos Operativos (POP), os documentos de apoio à qualidade (registos da qualidade, modelos aprovados) assim como o tratamento e eliminação dos registos, auxiliando, consideravelmente, a rastreabilidade dos documentos. Outros programas, tais como o **Apollo 2.0**, **Multi QC**, **Gestock** e **Express Thermo**, referidos na introdução deste relatório, vieram, de igual modo, dinamizar e facilitar o nosso trabalho diário.

Particpei ativamente na implementação do sistema de gestão da qualidade, cooperando na elaboração de POP, na criação de planos para a gestão do CQI e na organização dos documentos tais como bulas de reagentes, controlos e calibradores.

I. Organização diária no laboratório

A principal tarefa de um laboratório consiste em realizar um processo complexo, repartido em dois grandes processos, cujas ações tem por origem um pedido de análises e a saída dos resultados.

O **processo de realização do serviço** obedece a várias regras estabelecidas no Manual da Qualidade, que descrevem os passos a seguir, pelos colaboradores, para a **gestão e análise do produto biológico** nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, minimizando, dessa forma, as variáveis que podem afetar a qualidade dos resultados. As atividades associadas, que contribuem para o bom funcionamento deste processo, incluem a gestão dos recursos humanos, infraestruturas, EMM, informação e aprovisionamento.

O **processo de gestão da qualidade** visa ao cumprimento dos objetivos e da política da qualidade, recorrendo a reuniões de planeamento e de revisão entre os gestores, nas

quais são apresentados os pareceres das auditorias internas, resultados de audição de utentes e eventuais reclamações, assim como as ações corretivas e preventivas realizadas no seio do laboratório.

a. Gestão e análise do produto biológico

i. Fase pré-analítica

A percentagem de erros laboratoriais ocorridos nesta fase é cerca de 68%, sendo, por tal razão, importante reforçar a formação das pessoas envolvidas. A fase pré-analítica segue uma sequência de passos: a solicitação do pedido de análise do utente (geralmente solicitado pelo médico), as condições de colheita implicadas, a abertura do processo de utente, a identificação dos recipientes de colheita e sua realização pelo flebotomista, o transporte dos produtos para o laboratório quando as colheitas são efetuadas em postos de colheitas, a conservação da amostra antes da realização da análise e o processamento pré-analítico das amostras (Gestão da fase pré-analítica: Infoqual, 2005). É necessária a verificação de todos estes passos para que se possa seguir para a fase seguinte do processo – fase analítica.

ii. Fase analítica

A percentagem de erros laboratoriais, na fase analítica, tem vindo a diminuir, substancialmente, ao longo dos anos, devido à introdução de métodos de otimização tais como a introdução de sistema de leitura de código-barras no laboratório, a utilização de equipamentos com tecnologias mais avançadas bem como mais precisas, a formação contínua dos técnicos de laboratório, etc.

Os procedimentos adotados nesta fase processam-se da seguinte forma: a triagem é efetuada pela técnica que colhe ou/recebe as amostras, recorrendo ao leitor de códigos de barras. Procede-se então à ordenação e distribuição das mesmas, de acordo com as respetivas secções. Nesta etapa é possível rejeitar qualquer amostra que não reúne condições de prosseguir (volume insuficiente, erro de recipiente, amostra não identificada corretamente), tratando-se de uma Não Conformidade (NC). A preparação dos equipamentos, no que respeita a reagentes, calibradores e controlos, para a posterior realização das análises, é feita pela técnica responsável, de acordo com a matriz de competências estabelecida pela DT. A avaliação do CQI do equipamento é realizada pela própria técnica, considerando as cartas de controlo e as regras estatísticas aplicadas (Regras

de Westgard e Levey-Jenings). Geralmente, o CQI é útil na detecção de erros aleatórios e na correção atempada dos mesmos, sendo que, os limites das cartas de controlo devem ser encontrados em função dos resultados obtidos pelo próprio laboratório e não do fabricante. O tratamento dos dados da AEQ está sob a responsabilidade da DT, cuja tarefa consiste em corrigir os possíveis erros sistémicos. Um processo analítico é considerado *sob controlo* quando os resultados obtidos do CQI e da AEQ se situam dentro dos limites definidos.

No entanto, embora o resultado obtido do CQI possa estar dentro dos limites referenciados, devemos manter-nos vigilantes quanto ao bom funcionamento do equipamento porque podem surgir situações aleatórias, como por exemplo, uma má pipetagem ou má agitação numa determinada amostra, que podem comprometer a exatidão dos resultados. Nessa situação, o conhecimento técnico do aparelho e seus limites revelam-se essenciais para a detecção dessas possíveis alterações.

Ao verificar que o controlo está conforme, prossegue-se então à validação dos resultados cujas regras foram definidas pela DT, tal como acontece na validação do hemograma (ver Algoritmo de validação do hemograma). Procede-se da mesma forma na imunologia, repetindo valores anormalmente baixos ou altos, de acordo com os processos anteriores do utente, caso se verifiquem. Após a validação analítica, executada pela técnica superior (TS), é necessário proceder ao armazenamento das amostras, para uma eventual confirmação posterior de resultados, pedida pela DT, no momento que antecede a validação biopatológica (Gestão da fase analítica: Infoqual, 2005).

iii. Fase pós-analítica

A validação biopatológica é da exclusiva competência da especialista, que compara os resultados atuais com os anteriores, caso existam, verificando a sua coerência. Essa validação é concretizada via informática, pela assinatura digital da DT, originando de imediato um boletim analítico que será impresso e entregue pelas administrativas ao utente (Gestão da fase pós-analítica: Infoqual, 2005).

b. Gestão das atividades de apoio

As atividades de apoio ao processo de realização do serviço, cuja participação ativa compete em grande parte às técnicas superiores, correspondem à **gestão do aprovisionamento, das infraestruturas e dos EMM**.

Eu, enquanto TS, efetuo as encomendas do material de laboratório e verifico, aquando da sua chegada a validade, acondicionamento e integridade do produto. Toda essa gestão de aprovisionamento é possível recorrendo ao programa Gestock.

No que diz respeito à gestão das infraestruturas e dos EMM, compete-me seguir os planos de manutenção (diários, semanais, mensais) de cada equipamento analítico ou outro equipamento (refrigerífico, ar condicionado...) pelos quais estou responsável. A leitura semanal dos registos das temperaturas referentes aos refrigeríficos, congelador e estufa são igualmente da competência das TS que procedem à conformidade dos mesmos.

Para que não possam haver interferências na qualidade dos resultados ou do trabalho, a elaboração de uma NC relativa a um acontecimento pontual associado a uma dessas atividades ou outra, revela-se vital e deve ser elaborada por quem a deteta.

Finalmente, a **gestão de informação**, que corresponde ao arquivamento dos documentos obsoletos e a validação de novos, assim como a **gestão de recursos humanos** são da inteira responsabilidade da DT.

2. Processo de gestão da qualidade

As atividades associadas a este processo são, na maioria, da responsabilidade da DT e dos gestores. A auditoria interna é a única atividade que envolve diretamente as TS, na qual podem ser auditadas ou serem auditores. O regulamento interno define que é possível ser auditor interno quando a TS possui uma formação específica de pelo menos 25 horas, ou participou como acompanhante em 4 auditorias da qualidade a Laboratórios de Análises Clínicas (Gestão das Auditorias Internas: Infoqual, 2005). No ano anterior, participei como acompanhante em 5 auditorias internas, o que me permite desempenhar tais funções.

3. Condicionantes no laboratório

A implementação do sistema de gestão da qualidade é elaborada rigorosamente e visa à prestação de um serviço de excelência. É certo que possam existir num laboratório algumas condicionantes de diversa natureza, que interfiram diretamente ou indiretamente sobre a qualidade apresentada dos resultados.

A maior condicionante é de natureza económica porque *condiciona* todas as restantes, tais como os recursos humanos, a segurança, o ambiente e a gestão em geral, e pode eventualmente afetar a garantia de qualidade dos resultados. Considerando que o CQI tem a finalidade de verificar a calibração dos equipamentos analíticos e de garantir a

reprodutibilidade e a exatidão dos resultados, é importante que a DT estabeleça uma frequência correta da realização dos controlos internos, garantido dessa forma a qualidade dos mesmos. Geralmente, os controlos de parâmetros analisados em equipamentos automatizados comportam 2 ou 3 níveis diferentes. A situação ideal de controlo seria o processamento diário de todos os níveis, antes de qualquer corrida, para um determinado analíto. Contudo, essa situação pode não ser viável nas áreas de Imunologia e Hematlogia. Tal razão, deve-se a fatores de ordem económica, tendo em conta que os reagentes e controlos são dispendiosos e o nosso volume de trabalho, sendo inferior ao desejado, não compensa essa despesa. Atualmente, os diferentes níveis de controlo são efetuados de forma alternada ao longo da semana, e se por ventura houver alguma desconfiança quanto a valores anormalmente alterados, o controlo correspondente a esses valores é de imediato processado para garantir qualidade dos resultados.

Em termos de segurança, não existem condicionantes. Todas as normas de segurança são respeitadas no laboratório, uma vez que as instalações são recentes. O ruído sonoro, considerado condicionante ambiental, está abaixo dos limites aceitáveis perante a lei. A manipulação de produtos biológicos potencialmente perigosos e de reagentes químicos é feita na câmara de fluxo laminar, diminuindo o risco de exposição.

Penso que o nosso trabalho está bastante facilitado graças às ferramentas informáticas que dispomos, permitindo-nos uma melhor gestão da informação e rastreabilidade.

No LAC Virgílio Roldão, trabalhamos com qualidade, só precisamos é de mais trabalho para poder rentabilizar e compensar esse nosso esforço!

Conclusão

O estágio, propriamente dito, não veio alterar a minha rotina de trabalho no laboratório. Continuei a desempenhar as mesmas funções. Na minha opinião, os trabalhadores-estudantes, que realizam o estágio no seu local de trabalho, não beneficiam com essa situação, uma vez que o trabalho, enquanto estagiária, é equivalente ao trabalho diário enquanto funcionária.

No que diz respeito ao relatório de estágio, aí sim, existem mais-valias. No meu caso, passei a ler os manuais dos equipamentos, fiz uma revisão aos conhecimentos e pesquisei imenso.

Estou satisfeita com a elaboração do meu relatório, embora 50 páginas não sejam suficientes para o desenvolvimento de duas áreas de laboratório. O conteúdo, *per si*, é muito generalista, não permitindo o aprofundamento dos temas abordados. Sugiro que para os alunos que já têm alguns anos de experiência em laboratório de Análises Clínicas, seria mais interessante redigir um relatório pormenorizado sobre um tema ou uma área.

Em suma, este mestrado leva-me a crer ser um válido contributo para o desempenho da minha função.

Referências bibliográficas

1. ALESSI MC., AILLAUD MF., JUHAN-VAGUE I. – Facteurs de risque thrombogènes et athérosclérose. Feuil Biol; XXXV(197):39-41, 1994.
2. BESSELAAR VAN DEN AMHP. – The significance of the international normalized ratio (INR) for oral anticoagulant therapy, JIFCC 3:146-53, 1991.
3. BOUNAUD MP., DURON F., INGRAND J. – Cahier de formation- Biologie médicale N°14, 1999.
4. CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M. – L’Hemostase. Méthodes d’exploration et de diagnostic pratique, Paris, Expansion scientifique, p344-7, 1975.
5. CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M. – L’Hemostase. Méthodes d’exploration et de diagnostic pratique, 2° édition, Expansion thérapeutique, 1980.
6. COLE E., HALL ER., WU KK – Principles of Antithrombotic Therapy. Litteton, p91,1984.
7. COOPER G. – Basic Lessons in Laboratory Quality Control, Ed Bio-Rad Laboratories, 2008.
8. DACIE V.J., LEWIS M.S. – Practical Haematology, Ed Churchill Livingstone, 6ªedição, 1984.
9. FILELLA X., – Utilidad clínica de los marcadores tumorales, Programa de Formación Continuada a Distancia **Tema 7**, FC AEFA, 2010.
10. GARCIA-ERCE A.J., LEZAUN M.A., – Anemias microcíticas: su diagnóstico diferencial y seguimiento por el laboratorio, Programa de Formación Continuada a Distancia **Tema 8**, FC AEFA, 2011.
11. GUYTON C.A. – Tratado de Fisiologia Médica, Ed Mc Graw-Hill, 9ªedição, 1996.

12. HENRY BERNARD J. – Diagnósticos Clínicos e tratamento por Métodos Laboratoriais, 19ª edição, Editora Manole, 1999.
13. HERES G.A., CABALLOS A. P., – Actualización en técnicas inmunoquímicas de aplicación en el laboratorio clínico, Programa de Formación Continuada a Distancia Tema 3, FC AEFA, 2010.
14. HURAUX JM., NICOLAS JC., AGUT H. – Virologie. Ed Flammarion Medecine-Sciences, Paris, 1985.
15. LEFRERE JJ., LUNEL F., MARCELLIN P., PAWLOTSKY JM., ZARSKI JP. – Guide pratique des hepatites virales, MMI Ed, Paris, 1998.
16. MC DONALD A.G, PAUL J., CRUICKSHANK B. – Atlas de Hematología, Ed Panamericana, 5ªedição, 1985.
17. MERCK SHARP & DOME, – Enciclopédia Médica volume 10, Perturbações do sangue. Cancro. Doenças do sistema imunitário, Edição QuidNovi.
18. MILLER O., GONÇALVES REIS R. – Laboratório para o clínico, 8ª edição Atheneu, 1999.
19. OPERATOR'S MANUAL CELL-DYN 3500 SYSTEM – 9140293A, February 1996.
20. PRADO CINTRA F., RAMOS J., VALLE RIBEIRO J. – Atualização terapêutica- Manual prático de diagnóstico e tratamento, Ed Ramos Luiz O., 18ªedição, 1997.
21. SULTAN C., PRIOLET G., BEUZARD Y., ROSA R., JOSSO F. – Techniques en hématologie, Ed. Flammarion, 1978.
22. SULTAN C., GOUAULT-HEILMANN M., IMBERT M. – Aide mémoire d'hématologie, Ed. Flammarion, 1987.

Endereços Internet

http://www.aidsportugal.com/Modules/WebC_AIDS/Articles/ViewArticles.aspx?Mid=177&Aid=3099

http://germanodesousa.com/media/uploads/homepage/large/pdf/Germano_AnemiaPerniciosa.pdf

<http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>

[Roche e-LabDoc](#)

<http://www.roche.pt/hepatites/>

[Serviço Cliente - Biblioteca Técnica - bioMérieux Portugal, Lda.](#)