

Patrícia Achando

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo
Dr Jorge Humberto Tomaze apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



A estagiária

(Patrícia Achando)

Índice

1. Resumo	5
2. Abreviaturas.....	6
3. Introdução	8
4. Organização e Gestão do Laboratório.....	8
4.1. Caracterização do Laboratório.....	8
4.2. Localização e Horário de Funcionamento.....	8
4.3. Recursos Humanos	9
4.4. Organização do Laboratório	9
4.5. Sistema Informático	10
4.6. Gestão de Resíduos.....	10
5. Fase Pré-Analítica	11
6. Imunohematologia	11
6.1. Classificação Sanguínea Sistema ABO.....	11
6.2. Classificação Sanguínea Sistema Rh.....	13
6.3. Outros Sistemas de Classificação Sanguínea.....	13
6.3.1. Sistema MNS.....	13
6.3.2. Sistema Kell.....	14
6.3.3. Sistema Lewis.....	14
6.3.4. Sistema Duffy	14
6.4. Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI).....	14
6.5. Identificação de Anticorpos Irregulares.....	15
6.6. Teste de Antiglobulina Humana Directo (TAD).....	15
6.7. Eluado (eluição ácida).....	15
6.8. Titulação de Anticorpos	16
6.8.1. Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN).....	16
6.9. Aglutininas a frio.....	17
6.10. Provas de Compatibilidade	17

6.11. Reações Transfusionais.....	18
6.12. Hemovigilância.....	18
6.13. Imunohematologia e Biologia Molecular.....	19
6.14. Equipamentos e Reagentes da Imunohematologia	19
7. Dádiva de Sangue.....	20
8. Equipamentos e Reagentes.....	22
9. Casos Clínicos.....	24
10. Virologia	28
10.1. Equipamentos e Reagentes	28
10.1.1. Virologia.....	28
10.1.2. Biologia Molecular Doentes.....	29
10.2. Hepatite A	31
10.3. Hepatite B.....	32
10.3.1. Carga Viral HBV*.....	33
10.3.2. Genótipo HBV*.....	33
10.3.3. Resistência à terapêutica do HBV*.....	33
10.3.4. Mutações do Pré Core*.....	34
10.3.5. Sequenciação*.....	34
10.4. Hepatite C	34
10.4.1. Inno-Lia HCV*.....	35
10.4.2. Carga Viral HCV*.....	35
10.4.3. Genótipo HCV*.....	35
10.4.4. Polimorfismo da IL28B*.....	35
10.5. Hepatite Delta	35
10.5.1. Carga Viral HDV*.....	36
10.6. Hepatite E.....	36
10.6.1. Carga Viral HEV*.....	36
10.7. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	36

10.8. Vírus Humano da Leucemia das Células T (HTLV)	37
11. Outros parâmetros determinados nos doadores de sangue.....	37
11.1. Transcription Mediated Amplification (TMA)	37
11.2 Sífilis.....	37
11.3. Malária	37
12. Controlo de Qualidade.....	38
13. Casos Clínicos.....	39
14. Conclusão	41
15. Bibliografia.....	42

I. Resumo

O documento pretende abordar de forma estruturada, todos os aspectos inerentes à realização do estágio curricular em análises clínicas no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. O estágio decorreu no Serviço Sangue e Medicina Transfusional do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

Pretende elucidar sobre aspectos técnico-científicos, realçando a importância da aplicação dos conhecimentos teóricos nas diversas situações práticas que surgem diariamente nas rotinas laboratoriais.

Abstract

The document addresses, in a structured way, all the aspects concerning the internship in clinical analysis, held in the framework of the master's degree in Clinical Analysis. The internship held on Blood Bank and Transfusional Medicine of Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

It elucidates technical and scientific aspects, enhancing the importance of theoretical knowledge application on practical situations that occurs daily in a laboratory.

2. Abreviaturas

Ac- anticorpo

AcHBc- Anticorpo da cápside do vírus da hepatite B

AcHBs- Anticorpo para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

AcHBe- Anticorpo da proteína solúvel do vírus da hepatite B

Ag- Antígeno

AgHBc- Antígeno do core do vírus da hepatite B

AgHBe- Antígeno da proteína solúvel do vírus da hepatite B

AgHBs- Antígeno de superfície viral do vírus da hepatite B

AHAI- Anemia hemolítica auto-imune

BCP- Basal core promotor

cDNA- ácido desoxirribonucleico complementar

CE- Concentrado de eritrócitos

CHCM- Concentração de hemoglobina corpuscular média

CHUC- Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

CI- Controlo interno

CQE- Controlo de qualidade externo

CMV- Citomegalovírus

CPD- citrato-fosfato-dextrose

DHRN- Doença hemolítica do recém-nascido

ddNTP - didesoxinucleótideo trifosfato

DNA- ácido desoxirribonucleico

EIA- Imunoenzimáticas

ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

HAV- Vírus da hepatite A

Hb- Hemoglobina

HBV- Vírus da hepatite B

HCV- Vírus da hepatite C

HCM- Hemoglobina corpuscular média

HDV- Vírus da hepatite D

HEV- Vírus da hepatite E

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

Ht- Hematócrito

HTLV- Vírus Humano da Leucemia das Células T

HVR- Região hipervariável

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

IPST- Instituto Português do Sangue e Transplantação

ISO- International Organization for Standardization

PAI- Pesquisa de anticorpos irregulares

PCQEI- Programa Controlo de Qualidade Externo Imunohematologia

PCR- Polimerase chain reaction

PLT- Plaquetas

RBC- Eritrócitos

RLUs- Unidades relativas de luz

RNA- ácido ribonucleico

SAGM- sódio, adenina, glicose e manitol

SSMT- Serviço de Sangue e Medicina Transfusional

TAD- Teste antiglobulina directa

TAI- Teste antiglobulina indirecta

TAN- Nucleic acid test

TMA- Transcription Mediated Amplification

UK NEQAS- UK National External Quality Assessment Service for Microbiology

VCM- Volume corpuscular médio

WBC- Leucócitos totais

3. Introdução

A conclusão do Mestrado em Análises Clínicas implica a frequência obrigatória de um estágio em Laboratórios de elevada qualidade técnica e científica.

O estágio é de extrema importância na formação e desenvolvimento do analista clínico, uma vez que permite a ligação dos conhecimentos teóricos adquiridos na faculdade com situações práticas da rotina diária de um Laboratório. Constitui o primeiro contacto do futuro analista clínico com a realidade de um Laboratório, com a respectiva organização de trabalho, sistemas de garantia de qualidade, as questões de segurança no Laboratório, assim como a capacidade de resolução de situações imprevistas.

O estágio decorreu entre Outubro e Julho de 2013, no Laboratório do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional (SSMT) do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra-Pólo HUC sob a orientação do Director do Serviço Dr. Jorge Tomaz.

O presente documento tem como objectivo descrever de forma sucinta, todas as tarefas realizadas e conhecimentos adquiridos nas valências de Imunohematologia e Virologia, e aproveito para enfatizar a importância da dádiva de sangue.

4. Organização e Gestão do Laboratório

4.1. Caracterização do Laboratório

A história do Laboratório prende-se com a história do hospital uma vez que é um serviço de vital importância. O SSMT tem esta denominação uma vez que tem colheita de doadores e disponibiliza componentes sanguíneos. O objectivo deste serviço é ser reconhecido por estar sempre na vanguarda da qualidade e segurança transfusional. Encontra-se em processo de certificação de acordo com a Norma ISO 9001 de 2008.

4.2. Localização e Horário de Funcionamento

O SSMT localiza-se no rés-do-chão do Pólo Hospitais da Universidade de Coimbra, sito na Praceta Carlos Mota Pinto 3030 Coimbra.

O Laboratório funciona de forma ininterrupta, uma vez que tem um serviço de urgência que assegura todos os pedidos transfusionais. O horário para atendimento a doadores é de segunda a sexta-feira das 9.00 às 13.00 e das 14.00 às 17.00. Aos fins-de-semana e feriados o horário é das 9.00 às 13.00 e das 14.00 às 16.00.

Para a recepção de amostras com pedidos de rotina, como os marcadores virais, quantificação das cargas virais, determinação do grupo sanguíneo entre outras, a recepção é efectuada até às 14.00. Pedidos devidamente justificados são recepcionados a qualquer hora e efectuados, como por exemplo os marcadores virais dos acidentes de trabalho e pedidos de componentes sanguíneos.

4.3. Recursos Humanos

O bom funcionamento do Laboratório depende da competência do seu quadro profissional. A equipa que integra o SSMT é multidisciplinar e estão obrigados a cumprir criteriosamente os procedimentos em vigor no Laboratório uma vez que se encontra em Processo de Certificação.

A direcção do serviço está a cargo do Dr. Jorge Tomaz, e conta com a colaboração de uma vasta equipa nomeadamente: médicos especialistas em Imunohematologia, farmacêuticos, técnicos de análises clínicas, assistentes sociais, enfermeiros, administrativos e assistentes operacionais.

4.4. Organização do Laboratório

O Laboratório subdivide-se em diversos sectores que apesar de se encontrarem interligados funcionam de forma autónoma, cada sector tem um responsável que valida apenas os seus resultados.

Possui uma sala de atendimento a dadores onde estes preenchem os inquéritos e onde tomam pequenas refeições pós dádiva. Possui uma secretaria onde ocorrem diversos processos administrativos como introdução de dadores no sistema informático, envio das análises aos dadores, etc.

A promoção da dádiva funciona no mesmo espaço físico, e o responsável trata de toda a burocracia inerente à promoção da dádiva assim como agenda as diversas colheitas em unidade móvel.

Existe um gabinete médico onde é feita a consulta a dadores, só após a aprovação médica o dador segue para a sala de colheitas. Nesta sala é efectuada a colheita de sangue, dispõe de um carro de emergência devidamente equipado caso haja alguma ocorrência.

O Laboratório de Imunohematologia divide-se em Imunohematologia doentes e dadores. Enquanto que o primeiro é responsável pelas análises realizadas a doentes, como por exemplo classificação do grupo sanguíneo, teste antiglobulina directo, entre muitas outras. O segundo é responsável pelas análises efectuadas a dadores, como por exemplo

fenótipo Rh, classificação do grupo sanguíneo, pesquisa de anticorpos irregulares. A execução dos hemogramas fica também a cargo deste Laboratório.

O Laboratório de Virologia é responsável por todas as análises de virologia realizadas a doentes e a dadores, quer seja por técnicas de quimioluminiscência ou por técnicas ELISA.

O Laboratório de Biologia Molecular doentes realiza uma série de análises tendo por base os ácidos nucleicos dos vírus. São pesquisados RNA do vírus HEV, HCV, HDV e DNA do HBV.

O Laboratório de Biologia Molecular Imunohematologia é um projecto a realizar num curto prazo.

O Laboratório de Separação e Produção de Componentes é responsável pelo processamento das unidades colhidas aos dadores, respectiva rotulagem e controlo de qualidade.

O Laboratório de Urgência assegura que todos os pedidos de componentes sejam satisfeitos. É neste Laboratório que se efectuam todos os testes pré-transfusionais.

O SSMT dispõe de uma biblioteca onde ocorrem as reuniões do serviço. Há ainda uma sala de despejos, onde os assistentes operacionais acondicionam os resíduos líquidos e onde preparam o material para enviar para a esterilização. As instalações sanitárias são duas para os funcionários e uma para os dadores.

4.5. Sistema Informático

O SSMT dispõe de dois *softwares* distintos o SIBAS onde são introduzidos todos os pedidos de componentes sanguíneos e todos os dadores que realizaram dádiva. No ANASIBAS são introduzidas todas as outras análises que se fazem no serviço.

4.6. Gestão de Resíduos

O SSMT acondiciona devidamente os resíduos produzidos e é uma empresa contratada pelo hospital que está encarregue pela recolha dos resíduos. O Despacho 242/96 de 13 de Agosto distingue os tipos de resíduos não perigosos (Grupos I e II) e perigosos (Grupos III e IV), bem como os requisitos aplicáveis a cada um.^[1] Os resíduos equiparados a urbanos e os hospitalares não perigosos são colocados em contentores com saco preto e são tratados como resíduos urbanos. Os resíduos hospitalares de risco biológico são colocados em contentores amarelos com o símbolo de risco biológico, e devem ser armazenados em local próprio até ser feita a recolha. Estes contentores devem estar no local onde os resíduos se produzem diminuindo assim o risco de acidente para os

profissionais. Os resíduos hospitalares específicos como cortantes e perfurantes devem ser acondicionados em contentores vermelhos imperfuráveis com sinal de risco biológico. Os resíduos líquidos são acondicionados em contentores que são recolhidos pela empresa.

5. Fase Pré-Analítica

Esta é uma fase crítica que condiciona de forma inequívoca a qualidade dos resultados. A maioria dos erros no processo laboratorial ocorre nesta fase, como por exemplo a colheita em tubo inadequado, a identificação incorrecta dos doentes, etc. O transporte e conservação das amostras até à realização dos testes são cruciais na qualidade dos resultados.^[2] Contudo no SSMT as colheitas não são executadas pelos profissionais que integram a equipa, as amostras e respectivas requisições já chegam colhidas. Assim, cabe ao técnico que faz a recepção avaliar as condições em que chegam as amostras, se o volume for insuficiente, se a identificação não for coincidente entre tubos e requisições, o tubo é colocado no lixo e a requisição devolvida.

As medidas extremas na recepção de amostras neste Laboratório prendem-se com o facto de os erros de identificação do doente e/ou da amostra de sangue serem os principais responsáveis pelas reacções transfusionais graves que põem em risco a vida do doente, como é o caso das incompatibilidades AB0. A pessoa que efectua a colheita, deverá colocar o seu número mecanográfico no tubo, assumindo a responsabilidade de ter colhido a amostra após confirmação da identificação do doente.^[3]

6. Imunohematologia

A Imunohematologia é uma área essencialmente laboratorial que baseia o seu estudo nos antigénios eritrocitários e respectivos anticorpos e o seu significado clínico, como objectivo garantir a segurança imunológica da transfusão.

6.1. Classificação Sanguínea Sistema AB0

O sistema AB0 é o mais importante em imunohematologia devido à sua imunogenicidade, daí que a qualidade e a segurança dos testes deva ser estritamente assegurada.

O sistema de classificação sanguíneo AB0 foi descoberto por Karl Landsteiner em 1900. ^[4] Os antigénios do grupo A e B resultam da modificação de um carboidrato precursor, designado substância H. Assim por acção enzimática é adicionada à substância H a N-acetilgalactosamina e N-galactose formando o antigénio A e B, respectivamente.^[5] De

acordo com os antígenos e os anticorpos presentes os indivíduos podem ser A, B, AB ou 0, de acordo com a tabela I.

Grupo Sanguíneo	Antígenos nos glóbulos vermelhos	Anticorpos no plasma
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
0	Nem A nem B	Anti-A e Anti-B
AB	A e B	Nem anti-A nem anti-B

Tabela I: Distribuição de antígenos e anticorpos nos diferentes grupos sanguíneos.

Estes anticorpos surgem naturalmente em indivíduos saudáveis com menos de 3 meses para os antígenos em falta, designam-se naturais por aparecerem sem estimulação do sistema imune.^[5,6]

A classificação AB0 é obtida através da prova celular e da prova sérica, sendo que o grupo AB0 só pode ser definido quando há concordância entre ambas as provas. Na prova celular, é testada uma suspensão eritrocitária com soros comerciais Anti-A e Anti-B, não sendo obrigatória a utilização do soro Anti-AB. Na prova sérica, é testado o soro ou plasma do doente com suspensões de eritócitos comerciais A1 e B, não sendo obrigatória a utilização de suspensão A2 e 0.^[6]

A tabela II apresenta as reacções típicas da prova celular e sérica para cada um dos grupos.

Grupo Sanguíneo	Prova Celular		Prova Sérica	
	Anti-A	Anti-B	Células A	Células B
A	+	0	0	+
B	0	+	+	0
AB	+	+	0	0
0	0	0	+	+

Tabela II: Reacções da prova celular e sérica nos diferentes grupos sanguíneos. (Onde + representa aglutinação e 0 ausência de aglutinação)

Por vezes há discrepâncias entre prova celular e sérica, muita das vezes é por ausência de anticorpos, devido à idade avançada dos doentes, estado imunitário deficiente, etc, outras é por alteração da expressão dos antígenos devido a doenças malignas, nomeadamente leucemias e linfomas.^[6,7] Nos recém-nascidos até aos 4 meses não se faz prova sérica, uma vez que os anticorpos circulantes são de origem materna.

Em caso de transfusão urgente, deverá ser seleccionado sangue do grupo 0, não devendo assumir-se o resultado de nenhuma das provas (sérica e celular) individualmente.^[6]

6.2. Classificação Sanguínea Sistema Rh

É o segundo sistema de classificação sanguínea mais importante, foi descoberto em 1940 por Landsteiner e Wiener. Este sistema tem como principal antígeno o antígeno D, que está muitas vezes implicado na Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN). Os termos Rh positivo ou Rh negativo têm em conta a presença ou ausência do antígeno D, respectivamente.^[5,6]

Os outros antígenos deste sistema são o E, e, C e c, o fenótipo do sistema Rh é feito tanto nos doentes como nos dadores. A suspensão de eritrócitos é testada com anti-soros comerciais Anti-E, Anti-e, Anti-C e anti-c, e a presença ou não de aglutinação evidencia ou não, a existência ou ausência dos antígenos.

O antígeno D pode apresentar expressões mais fracas, de natureza quantitativa (D fraco) e/ou de natureza qualitativa (D parcial), são ambos considerados D variante. Sempre que um D variante é detectado em doentes, o doente considera-se Rh negativo, para diminuir a possibilidade de imunização. Quando um D variante é detectado em dadores estes são considerados Rh positivo.^[3,6]

6.3. Outros sistemas de Classificação Sanguínea

Um sistema de classificação sanguíneo é definido, de acordo com a International Society Blood Transfusion (ISBT) quando os antígenos são produzidos a partir de genes alelos do mesmo *locus* ou por um complexo de dois ou mais genes homólogos intimamente ligados, sem que haja recombinação entre eles.^[8,9]

6.3.1 Sistema MNS

Os antígenos mais importantes do sistema MNS que influenciam a transfusão são: M, N, S e s. Os anticorpos deste sistema são anticorpos frios e do tipo IgM, quando não são reactivos a 37°C não têm importância clínica. Sofrem efeito dose, ou seja a sua reacção será mais forte com células MM do que com células MN.^[6,9]

6.3.2 Sistema Kell

Este é um complexo sistema com 24 antígenos sendo os mais importantes o K, k, Kp^a e Kp^b. Depois do sistema ABO e Rh este é o terceiro mais imunogénico, estando muitas vezes associado à DHRN. Os anticorpos deste sistema são normalmente quentes e do tipo IgG, são imunes, ou sejam são produzidos após exposição ao antígeno, embora haja casos onde o anti-K foi detectado em indivíduos que nunca tiveram contacto com outros eritrócitos para além dos seus.^[6]

6.3.3 Sistema Lewis

Este sistema incorpora 6 antígenos, sendo os mais importantes o Le^a e o Le^b. Os anticorpos deste sistema são quentes e podem ser naturais ou imunes.^[6]

6.3.4 Sistema Duffy

Os antígenos mais importantes deste sistema são o Fy^a e o Fy^b, este sistema tem uma particularidade: a maioria da população negra é Fy^a- e Fy^b- o que lhe confere protecção contra o *Plasmodium vivax*, uma vez que a glicoproteína Duffy é o receptor para este parasita. Os anticorpos deste sistema sofrem efeito dose, são quentes e do tipo IgG.^[6]

Muitos mais sistemas poderiam ser descritos, contudo estes são os de maior significado clínico.^[9]

6.4. Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI)

A PAI tem como objectivo a detecção de anticorpos anti-eritrocitários, de ocorrência não esperada, clinicamente significativos no soro/plasma. Estes anticorpos podem causar quadros hemolíticos graves, surgindo após transfusões sanguíneas ou gestações incompatíveis. A prevenção da aloimunização transfusional em pacientes cronicamente transfundidos, como os portadores de doenças oncohematológicas é uma prática constante na rotina laboratorial.^[10]

A PAI inclui, obrigatoriamente a realização de um teste de antiglobulina indirecto (TAI), o objectivo é pesquisar anticorpos no soro ou plasma. A antiglobulina humana é um anticorpo com acção sobre as cadeias pesadas das imunoglobulinas humanas. Na PAI utilizam-se suspensões eritrocitárias comerciais do grupo 0, com fenótipo conhecido, devendo estas suspensões possuir os antígenos que originam a detecção de anticorpos com significado clínico. Pode realizar-se a PAI em meio enzimático, ou seja adiciona-se uma enzima, normalmente papaína, potenciando algumas reacções.^[3,6,11]

A amostra para a PAI pode ser soro ou plasma, contudo não pode ter mais de 72h, porque o complemento é degradado. A PAI deve realizar-se a todos os doadores, uma vez

que condiciona a utilização dos componentes sanguíneos. Deve ser feita como teste pré transfusional, se após 72h for enviado novo pedido de transfusão o TAI volta a ser repetido.^[11]

6.5. Identificação de anticorpos irregulares

Sempre que o TAI seja positivo deve proceder-se à identificação da especificidade do(s) anticorpo(s) em causa. A metodologia é semelhante à do TAI contudo utiliza-se um maior número de suspensões do grupo 0, geralmente obtidas em painéis, garantindo uma maior variedade de fenótipos. Para se poder identificar a especificidade de um aloanticorpo com um grau de fiabilidade aceitável, deve ocorrer positividade com, pelo menos, duas suspensões positivas para o antígeno correspondente e ausência de positividade com outras duas suspensões negativas para o antígeno.^[3,11]

A identificação apenas fica completa após confirmação do fenótipo do doente/dador para o antígeno em causa. Assim, se o doente for positivo para o antígeno em causa, provavelmente tratar-se-á de um autoanticorpo (deverá realizar-se um teste de antiglobulina directo), se o doente for negativo para o antígeno em causa confirma-se a especificidade do aloanticorpo encontrado.^[11]

Se se tratar de um doente para realizar transfusão de glóbulos estes terão de ser negativos para o antígeno em causa, diminuindo a probabilidade de reacção transfusional e reduzindo a estimulação do sistema imune com mais antígenos.^[6,11]

6.6. Teste de Antiglobulina Humana Directo (TAD)

Este teste é realizado em sangue total e tem como objectivo pesquisar anticorpos que já estejam ligados à superfície dos glóbulos. Se adição da antiglobulina humana originar aglutinação o teste é positivo, é indicativo que os eritrócitos têm anticorpos ligados aos seus antígenos. O TAD deve executar-se quando há suspeita de anemias hemolíticas auto-imunes (AHAI), em recém-nascidos (RN) de puérperas não estudadas durante a gravidez, RN de puérperas Rh negativo, uma vez que os RN podem ser positivos e terem anticorpos da mãe ligados aos seus antígenos e RN de puérperas aloimunizadas com anticorpos clinicamente significativos.^[3,6]

6.7 Eluado (eluição ácida)

Quando o TAD é positivo é necessário fazer a diferenciação do tipo de anticorpo: IgG, IgM e IgA pelo TAD monoespecífico. No eluado pretende-se separar os anticorpos

ligados aos eritrócitos, pela utilização de um ácido, sendo este método apropriado para a eluição de anticorpos quentes.

Após a eluição deve ser feito o painel eritrocitário, determinando a especificidade do anticorpo ligado.

6.8 Titulação de anticorpos

Método de aglutinação em tubo, através do qual se pretende titular o ou os anticorpos irregulares identificados no soro/plasma de um receptor com Teste de Antiglobulina Indirecto (TAI) positivo. É de extrema importância na incompatibilidade Rh feto-materna, principalmente Anti-D, deve titular-se no soro da mãe. As mães que no início da gravidez tenham um aloanticorpo identificado, este deverá ser titulado com periodicidade curta durante a gravidez.

Neste método fazem-se diluições sucessivas do soro e fazem-se reagir com células comerciais com o antígeno em causa, o título é dado pela última aglutinação entre soro e células comerciais.

6.8.1 Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN)

A DHRN resulta da passagem de eritrócitos fetais pela placenta para a circulação materna. Se estes eritrócitos forem antigenicamente diferentes dos maternos, o sistema imune materno produz anticorpos do tipo IgM, que devido ao seu peso molecular é impossibilitado de atravessar a placenta. Numa segunda exposição, é desencadeada uma resposta mais rápida de anticorpos IgG, estes atravessam a barreira placentária ligando-se aos eritrócitos fetais. A presença de anticorpos ligados aos eritrócitos fetais conduz a uma destruição dos glóbulos pelo sistema reticulo-endotelial.^[12,13]

A DHRN é uma patologia grave que pode ter consequências nefasta para o feto ou RN. O aumento da hemólise conduz a um quadro de anemia e de icterícia, sendo as consequências mais graves a hidropsia fetal e a Kernicterus. A Kernicterus é uma encefalopatia bilirrubínica. Trata-se de uma patologia grave causada pelo excesso de bilirrubina, esta induz toxicidade nos gânglios da base e nos núcleos do tronco cerebral.^[12]

O facto de os antígenos de superfície dos sistema Rh serem responsáveis pelos casos mais graves de DHRN, justifica-se por serem mais imunogénicos e por existirem exclusivamente nos eritrócitos, enquanto que os antígenos do sistema ABO estão presentes em outros tecidos.^[13]

Actualmente, devido à administração de antiglobulina humana anti-D às mães Rh negativo, diminui muito a incidência desta doença. Contudo não há antiglobulina humana com especificidade pra outros antigénios, ocorrendo situações graves de DHRN.^[14] O tratamento destes RN pode passar pela fototerapia, transfusão de glóbulos e em casos de extrema gravidade há a necessidade de realizar uma transfusão exsanguínea.^[14]

6.9 Aglutininas a frio

A doença por aglutininas a frio representa uma minoria das causas de anemia hemolítica auto-imune (AHAI).

A destruição precoce dos eritrócitos resulta de um mecanismo imune mediado por anticorpos normalmente do tipo IgM que se ligam a antigénios ou que induzem a ligação de fracções do complemento à membrana eritrocitária, comprometendo o seu funcionamento, aglutinando os glóbulos vermelhos a uma temperatura inferior a 37°C. Para evitar a ligação destes anticorpos, a colheita deverá ser a quente com todo o material aquecido. Os quadros clínicos destes doentes pioram, significativamente no inverno.^[15]

São feitas diversas diluições do soro do doente que vão ser testadas com eritrócitos comerciais do grupo 0 do adulto, 0 do adulto papainizadas, 0 do cordão e com as células do doente lavadas. A incubação é feita a 4°C e todo o material utilizado deverá estar frio. O título das aglutininas a frio é dado pela última aglutinação positiva.

6.10 Provas de Compatibilidade

As provas de compatibilidade constituem um procedimento que tem por objectivo verificar *in vitro* a compatibilidade eritrocitária entre o dador e o receptor. Através das provas de compatibilidade é possível detectar incompatibilidades por anticorpos clinicamente significativos. Se o receptor tiver um anticorpo contra um dos antigénios da unidade que está a ser testada vai ocorrer reacção, conseqüentemente a unidade não pode ser utilizada neste doente, diz-se que a unidade é incompatível com o doente. As incompatibilidades que mais preocupam os profissionais dos diversos serviços de sangue são as do sistema AB0, pela gravidade de reacções transfusionais que originam.

A confirmação do AB0/ Rh D das unidades a transfundir deve ser sempre confirmada. É incubada uma suspensão de eritrócitos do dador com o soro do doente, se não houver reacção a unidade de glóbulos é compatível, caso haja reacção a unidade de glóbulos é incompatível não devendo ser transfundida.^[3,6] Nos RN até aos 4 meses, devido à imaturidade do seu sistema imune as provas de compatibilidade são realizadas com o soro da

mãe e as unidades seleccionadas, segundo o sistema AB0 e Rh deverão ser compatíveis com ambos.

Sempre que possível, os componentes a transfundir deverão pertencer ao mesmo grupo AB0/Rh D do doente e apresentar o mesmo fenótipo CcEe e Kell que o doente. Esta consideração assume extrema importância em doentes politransfundidos: doentes oncológicos, dialisados, queimados etc.

Quando não é possível a transfusão com o concentrado de eritrócitos (CE) idênticos ao receptor no sistema AB0, podem ser transfundidos CE compatíveis no sistema AB0, de acordo com a tabela III.^[3]

AB0 do Receptor	Fenótipo AB0 dos CE			
AB	AB	A	B	0
A	A	0		
B	B	0		
0	0			

Tabela III: Compatibilidade AB0 para os diferentes grupos sanguíneos.

6.11 Reacções Transfusionais

A transfusão não é isenta de riscos, contudo a frequência de reacções transfusionais diminuiu nos últimos anos devido à implementação de normas de qualidade. Actualmente, a sua maioria é devida a erro humano na identificação das amostras e/ou doentes.

Considera-se reacção transfusional imuno-hemolítica aquela que se traduz na diminuição da sobrevivência dos eritrócitos transfundidos. As reacções transfusionais podem ser imediatas ou tardias, sendo que as imediatas são a principal causa de morte associada à transfusão. As reacções transfusionais tardias surgem 24h até algumas semanas depois da transfusão. São, normalmente, de difícil diagnóstico a sintomatologia pode ser moderada ou ausente e é diagnosticada pela ausência de rendimento transfusional (diminuição da hemoglobina, sem outras causas aparentes) ou aumento das bilirrubinas.^[3,6]

6.12 Hemovigilância

A implementação de um programa de hemovigilância é obrigatória de acordo com o Decreto-Lei 267/2007 de 26 de julho. O programa de hemovigilância tem como objectivo

assegurar o aumento da segurança transfusional, e todos os profissionais devem reportar dados relativos a acidentes ou incidentes no decurso do processo transfusional.

6.13 Imunohematologia e biologia molecular

A determinação do fenótipo por hemaglutinação em pacientes aloimunizados, ou recentemente transfundidos, pode ser lenta e complexa conduzindo a resultados difíceis de interpretar.^[16,17]

A elucidação da base molecular da maioria dos antigénios eritrocitários permitiu o uso da biologia molecular para determinar a presença ou ausência dos alelos para os diversos sistemas de classificação sanguínea, determinando o seu genótipo.^[14,16]

O uso da biologia molecular pode ser extremamente útil em diversas situações, nomeadamente:

- Classificação de dadores e doentes para antigénios, para os quais não exista anti-soro disponível;
- Detecção de genes que resultam numa expressão fraca do antigénio;
- Resolução de discrepâncias entre prova celular e sérica;
- Determinação do fenótipo em doentes com TAD fortemente positivo;
- Determinação do fenótipo em doentes recentemente transfundidos;
- Determinação de fenótipo de dadores para determinados sistemas de classificação sanguínea.^[14,17]

O ideal de transfusão deveria incluir correspondência entre doente e CE nos principais sistemas de classificação sanguínea e com maior relevância clínica, nomeadamente ABO, Rh, Kell, Duffy, MNS.^[17]

6.14 Equipamentos e Reagentes da Imunohematologia

A urgência dispõe de diversos equipamentos, todos eles da BioRad, tem um Swing, SamplerII e o mais recente IH-1000. A imunohematologia doentes dispõe ainda do equipamento Techno.

Dada a simplicidade das reacções, estes equipamentos são pipetadores automáticos, pipetam as amostras, os soros e as células comerciais, de acordo com o teste seleccionado. O Techno e o IH-1000 têm incubadoras e centrífugas incorporadas enquanto os outros não. O IH-1000 é fechado, o operador intervém apenas na introdução da amostra e selecção de testes e validação dos resultados.

Em ambos os Laboratórios são utilizadas amostras de sangue colhidas em EDTA (tampa roxa), para todas as determinações em que seja necessário usar células ou em tubos sem preparação (tampa vermelha) para as restantes determinações.

Os reagentes e cards utilizados são controlados diariamente com controlo de qualidade interno da BioRad. Se algum lote for trocado durante o dia, é necessário controlar esse lote. Como os resultados não são quantitativos não se aplicam as regras de Westgard.

7. Dádiva de Sangue

A dádiva de sangue é de extrema importância para a sobrevivência de muitos doentes. Não é um produto que possa ser produzido e comercializado, daí que contemos com a boa vontade de todos os dadores.

Para ser dador de sangue deverá ter mais de 50Kg, ter entre 18 e 65 anos e ter hábitos de vida saudáveis. Não deverá dar sangue se teve contacto com drogas endovenosas, se costuma ter múltiplos parceiros sexuais, se foi operado nos últimos seis meses, se fez piercings ou tatuagens nos últimos quatro meses, entre muitas outras coisas. O importante é assegurar a saúde quer do dador quer do doente.^[18]

O dador depois de ser avaliado pelo médico, segue para a sala de colheitas onde lhe é efectuada uma colheita de sangue total, este é um procedimento que demora alguns minutos (5 a 8 min) o volume retirado é aproximadamente 450ml. Há dadores cuja dádiva é de plaquetas obtidas por aférese.

A aférese é um procedimento que permite a separação de componentes sanguíneos durante a dádiva, devolvendo os restantes produtos ao dador. Os separadores funcionam por ciclos, recolhem o sangue do dador, sujeitando-o a uma centrifugação, as plaquetas vão para o saco de recolha enquanto que os restantes produtos são reinfundidos no dador. Os separadores inicialmente obrigavam a duas punções, uma em cada braço, hoje em dia necessitam apenas de uma. O volume extracorporal utilizado neste procedimento é reduzido, diminuindo o risco inerente para o dador.^[19]

As unidades de sangue total ficam armazenadas em placas de butanodiol estas devem ter a temperatura compreendida entre 20-22°C, enquanto que as plaquetas colhidas por aférese ficam duas horas em repouso à temperatura ambiente.

As unidades de sangue são colhidas em sacos com anticoagulante citrato-fosfato-dextrose (CPD), após a colheita são enviadas ao laboratório de processamento de componentes.

Há diversos métodos para a separação de sangue total. O método manual consistia na centrifugação e na separação manual dos diversos componentes sanguíneos. O objectivo da hemoterapia moderna é fornecer produtos de elevada qualidade diminuindo os efeitos adversos da transfusão. Os processos automáticos conduzem a um aumento da reprodutibilidade e da standardização.^[20]

O sistema de processamento automático utilizado no SSMT é o Atreus®, este sistema combina centrifugação e separação de uma unidade de sangue total.^[21] Aqui as unidades de sangue total só são centrifugadas 6 horas após a colheita. As colheitas de ST podem ser processadas em 3 componentes (eritrócitos, plaquetas, plasma) ou em dois componentes (eritrócitos e plasma).

Após a centrifugação as plaquetas ficam em repouso uma hora à temperatura ambiente, são armazenadas em agitação constante a 20°-24°C. Ao concentrado de eritrócitos é adicionada uma solução aditiva (SAGM) que tem na sua constituição cloreto de sódio, adenina, glicose e manitol. Esta solução aditiva permite armazenar os CE durante 42 dias a 2-8°C.^[20] O cloreto de sódio mantém o meio isotónico, a adenina assegura o ATP, enquanto que a glicose e o manitol são essenciais ao metabolismo do eritrócito.^[20] Após a adição da solução aditiva sofrem um processo de leucoredução, todo o conteúdo é passado por um filtro que já vem incorporado no saco. Os filtros têm capacidade para remoção de 99,9% dos leucócitos. Após 1999 tornou-se obrigatória a desleucocitação, esta tem como objectivo diminuir os fenómenos de aloimunização, a doença do enxerto contra o hospedeiro e diminuir a probabilidade de transmissão de vírus cuja localização seja intraleucocitária como o Citomegalovírus (CMV).^[22]

Todo este procedimento é feito assegurando a esterilidade dos componentes, quando a integridade das tubuladuras é perdida os componentes são colocados no lixo.

Os tubos correspondentes às colheitas seguem para o Laboratório de virologia e para o Laboratório de imunohematologia dadores. No Laboratório de virologia os parâmetros obrigatórios são: dois marcadores do vírus da Hepatite B (HBV), o antígeno de superfície (Ag HBs) e anticorpo do cor (Ac HBc), o vírus da Hepatite C (HCV), o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Sífilis, Vírus Humano da Leucemia das Células T (HTLV) em dadores de 1ª vez ou que tenham estado em zonas endémicas e a biologia molecular, que pesquisa HIV, HCV e HBV. Em dadores que tenham estado alguma vez em zonas endémicas para o *Plasmodium* é pesquisado anticorpos anti-*Plasmodium*.^[23] (Estes parâmetros serão discutidos em pormenor no capítulo seguinte).

No Laboratório de imunohematologia dadores os parâmetros obrigatórios são a classificação sanguínea AB0, fenótipo Rh, pesquisa de anticorpos irregulares e é feito o hemograma. Todos os dadores Rh negativos são confirmados, com a técnica para o D fraco (Du).^[24] A suspensão de eritrócitos é incubada com anti-soro Anti-D comercial e é adicionada antiglobulina da mesma especificidade do anti-soro.

8. Equipamentos e Reagentes

O Laboratório de imunohematologia dadores dispõe de um equipamento para fazer os hemogramas Beckman Coulter e dois TECAN da BioRad para a determinação do grupo sanguíneo AB0, fenótipo Rh e pesquisa de anticorpos irregulares. Tal como acontece com os restantes Laboratórios, todos os reagentes utilizados são controlados diariamente.

O TECAN é um pipetador automático, apresentando um funcionamento semelhante aos aparelhos descritos anteriormente.

O analisador Beckman Coulter é um analisador automático de células sanguíneas para amostras individuais com tubo aberto ou por leitura automática por aspiração da amostra em tubo fechado. No modo automático as amostras são colocadas em racks, que são analisados sequencialmente sem intervenção do operador. Este contador automático é utilizado para o diagnóstico *in vitro*. Podem ser analisados diversos parâmetros hematológicos nomeadamente, leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLT) entre outros.

A interpretação dos resultados é realizada através de histogramas, que permitem a apreciação da contagem celular. O princípio da contagem baseia-se na impedância (WBC, RBC) e espectrofotometria no caso da Hb.

Após a execução de todas as análises, cada responsável de cada um dos Laboratórios procede à validação das mesmas. De salientar que, as análises da virologia têm de ser todas negativas para poderem ser utilizadas, e na imunohematologia dadores os valores do hemograma terão de ser valores dentro do intervalo normal.

Para as unidades poderem ser utilizadas, o médico de serviço deverá proceder à validação final. Posteriormente as unidades podem ser rotuladas, na rotulagem é necessário confirmar o nº de dador inscrito no saco com o do rótulo, e fazer a inspeção visual do componente. Os CE antes de poderem ser utilizados tem de ser retirado um segmento da tubuladura para confirmar que o conteúdo corresponde ao inscrito no rótulo, é efectuada

uma classificação ABD. As plaquetas depois de rotuladas são agrupadas em grupos de quatro e são integradas em pool, são desleucocitadas apenas nesta fase do processo. Devido à temperatura de armazenamento as plaquetas têm apenas 5 dias de validade. As plaquetas obtidas por aférese necessitam apenas de ser rotuladas. Depois de devidamente rotulados e verificados, os componentes sanguíneos são disponibilizados para o sector de urgência e estão prontos a ser utilizados.

Os componentes são sujeitos a um controlo de qualidade, a frequência de amostragem é determinada através de um controlo estatístico do processo. São efectuadas determinações de pH no último dia de validade das pools de plaquetas, determinação do nº de leucócitos residuais, avaliada a hemólise dos CE no último dia de validade e é feito controlo bacteriológico das unidades em ambiente aeróbio e anaeróbio.^[24] O pH deverá estar compreendido entre 6,4-7,4, a hemólise não deve ultrapassar os 0,8% da massa de eritrócitos, os leucócitos residuais devem ser inferiores a $0,05 \times 10^9$ por unidade e não deve haver crescimento bacteriano.^[24]

O relatório da Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação 2008-2011 reúne e processa as informações de todos os serviços de sangue do país. De acordo com este relatório o SSMT dos HUC:

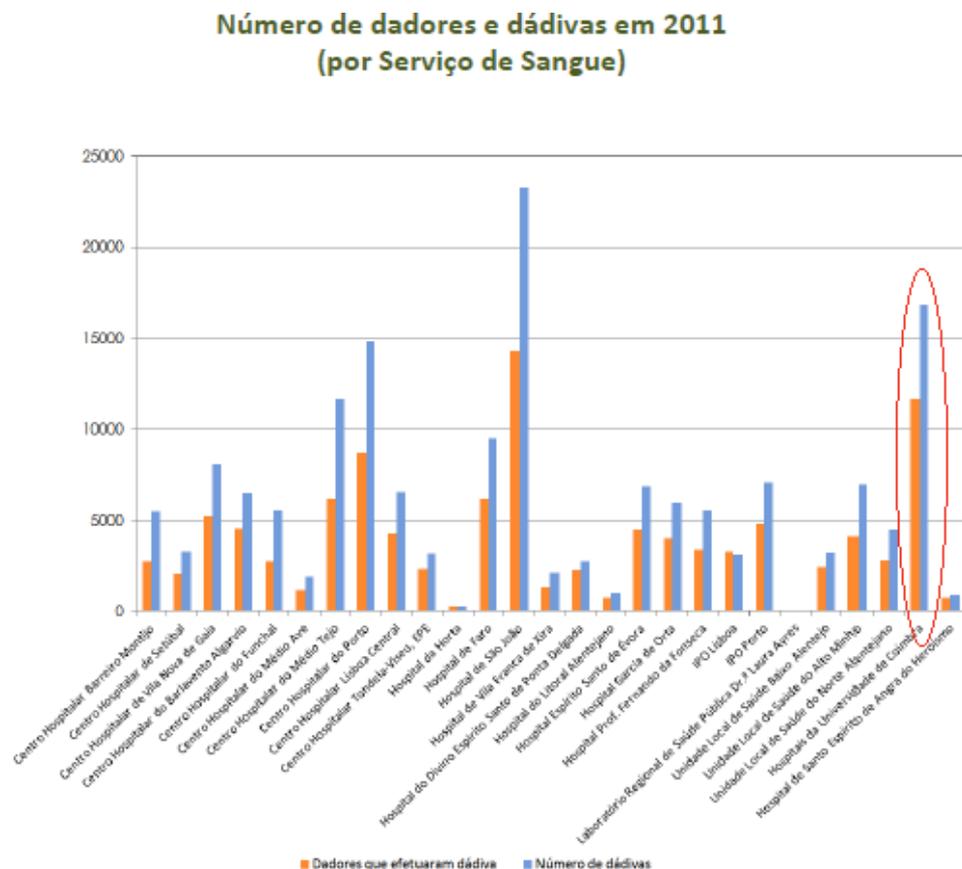
	2008	2009	2010	2011
n.º de dadores que efetuaram dádiva	17128	10717	11563	11623
n.º dádivas	16862	15296	15558	17062

Unidades Produzidas e Validadas				
	2008	2009	2010	2011
Eritrócitos	16673	14217	14212	16425
Plaquetas	2761	15225	14652	17920
Plasma				

Unidades Transfundidas				
	2008	2009	2010	2011
Eritrócitos	24215	25256	24982	23914
Plaquetas	3116 ⁷	11505	3449 ⁷	14426
Plasma				
Plasma SD	14271	13879	14497	13389

Em 2008 as plaquetas correspondem a 3013 de unidades de pools de plaquetas e 103 de unidades de plaquetas obtidas por aférese, enquanto que em 2010 correspondem a 3420 unidades de pools de plaquetas e 29 unidades de plaquetas obtidas por aférese.^[25]

Apresento um gráfico do mesmo relatório que evidencia a posição do SSMT face a outros serviços equivalentes:



O SSMT é a segunda instituição com maior número de colheitas, e o principal objectivo deste serviço é aumentar o nº de dadores e dádivas, de forma a ser auto-suficiente.^[25] Actualmente, ainda depende do Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST).

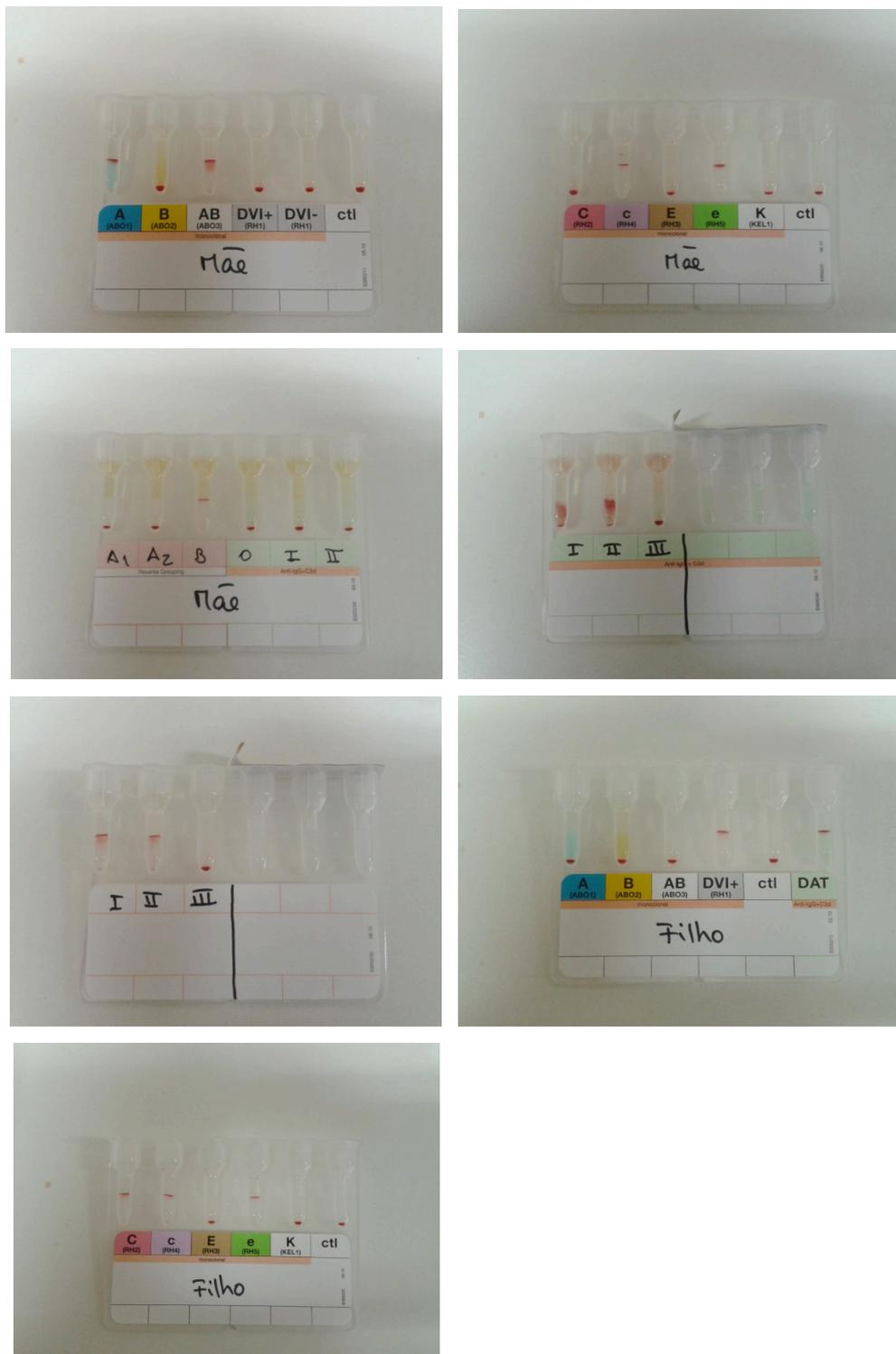
9. Casos Clínicos

Pedido de transfusão de 20 ml de eritrócitos para um recém-nascido com 3 dias.

É necessário classificar a mãe e filho, a mãe é um A Rh Neg ccdee K- e o filho 0 Rh Pos CcDee K-. A mãe apresenta um TAI positivo, foi identificado um Anti-D, o filho tem um TAD positivo, depois de se executar o método da eluição ácida foi identificado um Anti-D.

Relatório de Estágio no Serviço de Sangue e Medicina Transfusional do CHUC

O sangue escolhido deverá ser compatível com ambos e não deverá ter mais de cinco dias, as provas de compatibilidade deverão ser executadas com o soro da mãe. Posto isto o sangue escolhido foi um 0 Rh Neg ccdee K-. Apresentam-se em seguida os cards com as respectivas reacções.



Relatório de Estágio no Serviço de Sangue e Medicina Transfusional do CHUC

BIO-RAD Set ID-DiaPanel: 45161.10.x (Japan: 4516.10.xx) Set ID-DiaPanel P: 45171.10.x (Japan: 4517.10.xx) LOT: 06171.10.x - 06271.10.x (Japan: 0617.10.xx - 0627.10.xx) 05361.10.x - 05461.10.x (Japan: 0536.10.xx - 0546.10.xx) 2013.09.23 (Japan: 23.09.13) V.I.P. Software: P09

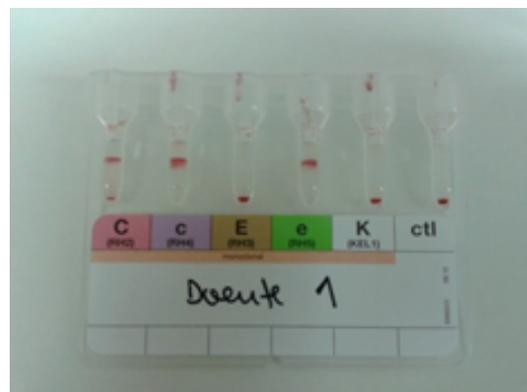
ID-DiaPanel ID-DiaPanel-P

Rh-ir	Spender Donor Donateur Donante Dador	Rh-ir													Kell													Duffy		Kidd		Lewis		P		MNS			Luth.		Xg		Spéc. Antigènes Special types Antigènes part. Otros Antígenos Tipos especiales	Resultado / Result / Result / Resultado / Risultato	LIS / Coombs	Enzyme	4°C	Bemerkungen / Remarks / Remarques / Note Observaciones / Observações
		D	C	E	c	e	C ⁻	K	k	Ko ^a	Ko ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	Xg ^b																				
1	CCCWd.ee R ₁ WR ₁	525717	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	1	3+	4+									
2	CCD.ee R ₁ R ₁	245101	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	2	3+	4+									
3	ccD.EE R ₂ R ₂	502452	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	nt	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	3	3+	4+										
4	CcCWddee r ^w r	480039	0	+	0	+	+	+	0	+	+	nt	nt	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	4	-	-											
5	ccddEe r ^w r	482950	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	5	-	-									
6	ccddeee rr	950720	0	0	0	+	+	+	0	+	+	nt	nt	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	6	-	-										
7	ccddeee rr	605828	0	0	0	+	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	7	-	-									
8	ccD.ee R ₀ r	484911	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	8	3+	4+									
9	ccddeee rr	204133	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	9	-	-								
10	ccddeee rr	740167	0	0	0	+	+	0	+	0	+	nt	nt	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Bg(a+)	10	-	-									
11	ccddeee rr	488635	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	Luc14 / Yt(a+b)	11	-	-								

Nome / Name / Nom / Nome / Nombre / Nome: D. T. T. T.
 Blutgruppe + Antigene / Blood group + antigens / Groupe sanguin + antigènes / Gruppo sanguigno + antigeni / Grupo sanguíneo + antígenos: Anti - D
 Datum / Date / Date / Data / Fecha / Data: _____

Pedido de transfusão de 2 unidades de eritrócitos e 1 pool de plaquetas para um senhor com uma leucemia.

É necessário classificar o doente e realizar as provas de compatibilidade. O doente é um A Rh Pos ccDee K-, apresenta dupla população no antígeno (Ag) C, por segurança considera-se Ag C negativo. O TAI foi positivo tendo sido identificado um Anti-Fya. As unidades compatibilizadas têm Ag Fya negativo. A pool seleccionada é um A Rh Pos. Apresentam-se em seguida os cards com as respectivas reacções.



Relatório de Estágio no Serviço de Sangue e Medicina Transfusional do CHUC



BIO-RAD Set ID-DiaPanel: 45161.10.x (Japan: 4516.10.xx) Set ID-DiaPanel P: 45171.10.x (Japan: 4517.10.xx) **LOT** 06171.10.x - 06271.10.x (Japan: 0617.10.xx - 0627.10.xx) 05361.10.x - 05461.10.x (Japan: 0536.10.xx - 0546.10.xx) 2013.09.23 (Japan: 23.09.13) **ID-DiaPanel ID-DiaPanel-P** V.I.P. Software: P09

Antigen-Tabelle / Antigen-Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabella de antígenos
 Antikörper-Identifizierung / Antibody identification / Identification d'anticorps / Identificazione anticorpale / Identificación del anticuerpo / Identificação do anticorpos

Rh-hr	Spender Donor Donateur Donatore Donante Dador	Rh-hr	Kell											Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS	Luth.	Xg	Spez. Antigene Special types Antigenes part Antigeni particolari Otros Antígenos Tipos Especiales	Resultat / Result / Resultat / Risultato / Resultado / Resultado			Bemerkungen / Remarks / Remarques / Note Observações / Observações						
			D	C	E	c	e	C'	K	k	Kp	Kp'	Js									Js'	Fy ^a	Fy ^b		Jk	Jk'	Le ^a	Le ^b	M	N
1	CCC ^W D.ee R ₁ WR ₁	525717	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	nt	nt	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Bg(+)	1	2+	-	
2	CCD.ee R ₁ R ₁	245101	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	nt	nt	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	Bg(+)	2	-	-	
3	ccD.EE R ₂ R ₂	502452	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	3	2+	-		
4	CcC ^W ddee r ⁺ W _r	480039	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	4	2+	-		
5	ccdEe r ⁺ r	482950	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	5	2+	-		
6	ccddee rr	950720	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	nt	nt	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	6	-	-		
7	ccddee rr	605828	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	nt	nt	0	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	7	-	-		
8	ccD.ee R ₀ r	484911	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	8	3+	-		
9	ccddee rr	204133	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	9	-	-		
10	ccddee rr	740167	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	10	-	-		
11	ccddee rr	488635	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	11	-	-		

Patient / Patient / Patient / Paciente / Paciente / Paciente
 Bemerkungen / Remarks / Remarques / Note Observações / Observações

Anmerkungen siehe rückseitig / Remarks see overleaf / Voir les remarques au verso / Per le note consultare il retro / Ver observaciones en el reverso / Ver observações no verso

Name / Name / Nom / Nome / Nombre / Nome Doente 1	Blutgruppe + Antigene / Blood group + antigens / Groupe sanguin + antigènes / Gruppo sanguigno + antigeni / Grupo sanguíneo + antígenos / Grupo sanguíneo + antígenos	Interpretation / Interpretation / Interpretation / Interpretazione / Interpretación / Interpretação Anti - Fya	Datum / Date / Date / Data / Fecha / Data
-------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------

8004115 10.11 10.07.2013 / 15.07 **DiaMed GmbH, 1785 Cressier FR, Switzerland, www.bio-rad.com/immunohematology**

10. Virologia

O Laboratório de virologia clínica assume uma importância crucial, uma vez que suporta o diagnóstico clínico, é importante no diagnóstico precoce, avalia a evolução da doença e da resposta aos tratamentos.

Todos os testes apresentados destinam-se a ser utilizados em conjunto com a apresentação clínica e com outros marcadores laboratoriais, com vista ao tratamento clínico dos pacientes.

10.1 Equipamentos e Reagentes

10.1.1 Virologia

O laboratório da virologia dispõe de diversos equipamentos que auxiliam os técnicos na execução das análises. Devido ao elevado fluxo de trabalho, há dias em que este laboratório processa mais de 250 amostras, possui dois Architect que executam técnicas de quimioluminescência, pertencentes à Abbott, um EVOLIS e um EVOLIS Twin, equipamentos que executam técnicas ELISA, pertencentes à BioRad. O TIGRIS é o equipamento que permite executar a NAT (nucleic acid test) dos doadores, pertencente à Siemens.

Os Architect baseiam o seu funcionamento em técnicas de quimioluminescência. Estes testes permitem detectar a presença de antígenos e/ou de anticorpos presentes numa amostra, através da presença de anticorpos e/ou antígenos complementares ligados a micropartículas magnéticas.^[26,27]

Assim, a amostra é misturada com o reagente e com as partículas magnéticas que têm os antígenos ou os anticorpos, consoante o que estamos a pesquisar, isto é se estivermos a pesquisar AchBe, por exemplo, as partículas estarão revestidas com AgHBe. Se houver anticorpos, estes ligar-se-ão aos antígenos presentes nas partículas magnéticas. Após a lavagem é adicionado conjugado com anticorpos anti-humanos marcados com acridina. O resultado é dado em unidades relativas de luz (RLUs). Quanto maior RLUs maior a quantidade de anticorpos presentes na amostra.^[28]

Há a necessidade de calibrar todos os reagentes, sem esta o equipamento não pode efectuar testes. A calibração de um Kit de reagente deve ser realizada sempre que se verifique uma ou mais das seguintes condições:

- Introdução de um novo lote de reagente;
- Quando os valores dos controlos começam sistematicamente a estar fora dos intervalos definidos;
- Quando expira uma curva de calibração.

Todos os testes são controlados diariamente recorrendo a controlos comerciais com diferentes níveis fornecidos pela Abbott. O controlo de qualidade interno (CQI) também é efectuado diariamente, como se explicará adiante.

Os EVOLIS baseiam o seu funcionamento nas técnicas imunoenzimáticas (EIA), nomeadamente Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) utilizando microplacas e tanto se pode pesquisar antigénios como anticorpos dependendo da especificidade do kit que estamos a usar. Os antigénios ou anticorpos complementares estão marcados enzimaticamente, assim a adição de um substrato origina uma reacção colorimétrica confirmando a presença do antigénio ou anticorpo. A intensidade da cor é proporcional aos complexos antigénio-anticorpo.

As análises obrigatórias nos doadores de sangue podem ser executadas por técnicas ELISA ou por quimioluminiscência, estando ambas disponíveis para optimização do trabalho em dias de maior afluxo de amostras.

O TIGRIS baseia o seu funcionamento na amplificação mediada por transcrição (TMA). De salientar que cada tubo de ensaio contem apenas uma amostra. Há equipamentos baseados na mesma metodologia que utilizam pool de seis amostras.

O Procleix Ultrio Assay, é um teste multiplex que permite a detecção simultânea de HIV, HCV e HBV, envolve três etapas principais que ocorrem num único tubo de ensaio, são elas:

- Preparação da amostra / Captura do alvo,
- Amplificação dos alvos RNA do VIH-I, RNA do HCV e DNA do HBV, através de TMA,
- Detecção dos produtos da amplificação, é medida a intensidade de fluorescência.

Este método não faz a discriminação da fluorescência para HIV, HBV ou HCV. Assim uma amostra positiva, poderá ser positiva devido a qualquer um destes vírus. Estas amostras deverão ser analisadas utilizando o ensaio discriminatório para HIV, HBV e HCV, onde cada sonda é usada individualmente.^[29]

10.1.2 Biologia Molecular Doentes

Todas as análises assinaladas com * são efectuadas no laboratório de biologia molecular doentes.

A biologia molecular tem um extractor de ácidos nucleicos, EasyMag, pertencente à BioMérieux; Cobas TaqMan e Ampliprep que executa a extracção, amplificação e detecção de ácidos nucleicos do HCV e HBV, pertencentes à Roche; sequenciador Long Read Tower,

pertencente à Siemens, INNO-Lipa onde se executam as técnicas de Western-Blott, genotipagem e outros pertencente à Quilaban; tem também um termocilador em tempo real, o Rotor Gene, pertencente à Quilaban.

O equipamento NucliSens® EasyMAG destina-se ao isolamento automático (purificação e concentração) de ácidos nucleicos totais (RNA/DNA) de amostras biológicas. Devido à introdução de partículas magnéticas, aproveitando a propriedade da sílica em fixar os ácidos nucleicos e à evolução dos reagentes, a qualidade de extracção para uma grande variedade de amostras aumentou significativamente com este equipamento.

O equipamento COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HCV baseia-se em três processos principais: (1) preparação da amostra para isolar RNA do HCV; (2) transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA), (3) amplificação por PCR do cDNA alvo e detecção dos ácidos nucleicos amplificados. No caso do HBV não há transcrição reversa, uma vez que o vírus é de DNA.^[30] A utilização de sondas Taqman permite a detecção, em tempo real do produto amplificado, através da medição da fluorescência. A intensidade da fluorescência é proporcional à carga viral.

O INNO-LiPA é o equipamento que permite determinar os genótipos do HCV e HBV assim como as mutações do pré-core e estudar as resistências do HBV.

O Genotyping é um ensaio que tem como princípio a hibridização reversa, em que o produto amplificado biotilado é hibridado com sondas oligonucleotídicas específicas imobilizadas em linhas paralelas nas tiras de nitrocelulose. Depois da hibridização, os ácidos nucleicos não hibridizados são retirados por lavagem, é adicionada estreptavidina com fosfatase alcalina que se liga a quaisquer híbridos biotilados formados anteriormente. A incubação com o cromogénio BCIP/NBT produz um precipitado púrpura/castanho, formando um padrão de linhas visíveis na tira de nitrocelulose.

A linha de controlo do conjugado é um controlo da reacção da revelação de cor e a linha de controlo de amplificação contém as sondas universais para verificar a presença de material genómico amplificado.^[31]

O Sequenciador LONG-READ TOWER™ é um sequenciador de DNA automático que consegue detectar fragmentos de DNA marcados por fluorescência.

O Trugene® HBV Genotyping usado em combinação com *software* OpenGene® permite a determinação do genótipo e das mutações do HBV em simultâneo. Esta metodologia baseia-se em seis etapas fundamentais, são elas:

- Extracção dos ácidos nucleicos;
- Amplificação, por PCR dos ácidos nucleicos;

- Sequenciação por CLIP® dos produtos amplificados;
- Desnaturação dos produtos amplificados;
- Electroforese dos diferentes produtos das reacções de sequenciação e
- Análise das sequências.

A sequenciação CLIP® revela informação sobre a região do AgHBs e da transcriptase reversa. As amostras amplificadas são adicionadas a tubos de reacção com dois primers marcados com dois corantes diferentes (Cy 5 e Cy 5.5) e a cada tubo é adicionado um didesoxinucleótideo trifosfato (ddNTP) que terminam a cadeia. No final da sequenciação é adicionado formamida com corante e as amostras são sujeitas a aquecimento para promover a desnaturação.

Os produtos da reacção são introduzidos num gel de poliacrilamida, a aplicação de um campo eléctrico obriga os fragmentos carregados negativamente a migrar para o ânodo.

Dentro do Sequenciador LONG-READ TOWER, os corantes fluorescentes ligados aos fragmentos de DNA em migração são excitados por um laser, os detectores determinam o comprimento de onda, esta informação é transmitida a um computador e armazenados os dados. Cada reacção necessita de quatro faixas, uma para cada ddNTP, é da combinação destas que se obtém a sequência completa.^[32]

As sequências são analisadas num *software* OpenGene® que tem por base uma biblioteca com a sequência do HBV e de todas as mutações mais relevantes.

O Rotor Gene é um termociclador rotativo, permite uma melhor distribuição do calor, que é o ponto crítico da PCR. Permite a detecção dos produtos amplificados em tempo real, utilizando sondas Taqman ou FRET.

10.2 Hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV) é um vírus de RNA que pertence à família *Picornaviridae*, sem envelope com cápside icosaédrica. A via de transmissão é oral-fecal.

Os anticorpos surgem uma semana após a infecção, os primeiros anticorpos a surgir são do tipo IgM, com a evolução da doença o título destes tem tendência a diminuir enquanto os de IgG continuam a aumentar. Existe vacina desde 1991, e é recomendada a pessoas que viajam com frequência para paíse onde esta doença é comum.^[26]

No laboratório de virologia pesquisam-se os anticorpos anti-HAV IgG e IgM por quimioluminiscência. Grande parte da população apresenta anti-HAV IgG positivo, não evolui para doença crónica.

10.3 Hepatite B

O vírus da hepatite B é um vírus de DNA, envelopado, com cápside icosaédrica que pertence à família *Hepadnaviridae*. No seu envelope estão presentes várias glicoproteínas virais, nomeadamente: as glicoproteínas S, M e L. As vias de transmissão podem ser várias: sexual, percutânea, vertical e mucocutânea.

O DNA do HBV é constituído por quatro genes (S, C, P e X) responsáveis pela produção de diferentes proteínas. Assim, o gene S codifica o antígeno de superfície (AgHBs); o gene C codifica o antígeno do core (AgHBc), o gene P codifica a polimerase e o gene X codifica a proteína reguladora HBx. O HBV possui 8 genótipos.^[33]

Existe vacina desde 1981, tem uma eficácia de 95% e faz parte do Plano Nacional de Vacinação.

O primeiro marcador de infecção a surgir é o AgHBs, seguido do AgHBe, sendo que a sua detecção traduz sempre existência de infecção. Relativamente aos anticorpos o primeiro a surgir é o AcHBc IgM, seguido do AcHBc IgG. A presença do Ac HBe pressupõe o desaparecimento do AgHBe. O último marcador a surgir e que se mantém por mais tempo é o AcHBs, contudo nem sempre assim é. A presença deste marcador traduz imunidade para a infecção por HBV, títulos superiores a 10 UI/ml conferem imunidade, no entanto o ideal seria títulos superiores a 100 UI/ml.^[27,28]

A interpretação dos marcadores serológicos permite avaliar o estado clínico dos doentes, como se pode ver na tabela IV.

Interpretação dos Marcadores Serológicos							
AgHBs	AgHBe	Ac HBs	Ac HBe	Ac HBc (IgM)	Ac HBc (IgG)	DNA do HBV	
+	+	-	-	+	+	+	Hepatite B aguda
+	+/-	-	+/-	+/-	+++	+	Hepatite B crónica
-	-	++	+/-	-	++	-	Infecção passada recente
-	-	-	+/-	-	-	+/-	Infecção passada distante
-	-	++	-	-	-	-	Vacinação

Tabela IV: Interpretação dos marcadores serológicos da infecção por HBV.

No laboratório de virologia pesquisa-se AgHBs, Ac HBc por quimioluminiscência ou ELISA. Foi implementado recente o AgHBs quantitativo, por quimioluminiscência para a determinação quantitativa do AgHBs no soro ou plasma. Este teste só deve ser executado em amostras previamente positivas. Pretende-se com este marcador avaliar a resposta ao tratamento, uma vez que há estudos que demonstram a correlação entre o AgHBs e a carga viral. É um estudo que está a ser realizado no laboratório. Todos os outros parâmetros (AcHBe, AgHBe e AcHBc IgM) são realizados por quimioluminiscência.

Há uma análise crítica aos pedidos que são enviados, se for pedido todo o perfil para a hepatite B, dependendo dos serviços, numa primeira fase só se realiza o AgHBs, Ac HBc, Ac HBs. Consoante os resultados obtidos é que se procede à realização dos outros parâmetros.

Quando um doente tem uma hepatite B confirmada, aguda ou crónica as amostras são processadas pelo laboratório de biologia molecular doentes, onde se efectua o doseamento da carga viral, a determinação do genótipo, o estudo das resistências à terapêutica, das mutações do pré-core e a sequenciação.

10.3.1 Carga Viral HBV*

A carga viral é o parâmetro que melhor avalia a resposta à terapêutica. O limite de detecção da técnica é de 20 UI/ml. A terapêutica antiviral deverá diminuir a carga viral para valores indetectáveis, quando tal não acontece deve ser avaliada a adesão à terapêutica, ou deve ser feita a pesquisa de mutações que conduzem ao aparecimento da resistência à terapêutica.^[28]

10.3.2 Genótipo HBV*

É importante a determinação do genótipo, uma vez que há genótipos que respondem melhor ao tratamento que outros. Quando o doente entra em remissão completa, é possível posteriormente, avaliar se foi infectado com uma estirpe nova ou se a inicial reactivou. Se o doente tem um genótipo 3, e entretanto for detectado um genótipo 4, é porque o doente foi infectado com uma nova estirpe. A co-infecção entre genótipos permite a recombinação.^[30]

10.3.3 Resistências à terapêutica do HBV*

A pesquisa de mutações que conduzem ao aparecimento da resistência à terapêutica, reveste-se de extrema importância no desenho do esquema terapêutico. Se for detectada

uma mutação que confere resistência a um fármaco que está a ser administrado, o clínico pode alterar imediatamente o esquema terapêutico.

A maioria das mutações que conferem resistência aos fármacos ocorre na região da transcriptase reversa do gene da polimerase do HBV. Esta região tem sete domínios conservados denominados de A a G. Nestes domínios existem oito codões associados à resistência a fármacos, são eles: 169, 180, 181, 184, 202, 204, 236 e 250. [33]

10.3.4 Mutações do Pré Core*

A pesquisa de mutações no pré-core é importante uma vez que estas mutações podem diminuir a expressão de AgHBe. Quando não se detecta o AgHBe não se pode excluir a existência de replicação viral.

Usando o INNO-LiPA HBV Pré-Core, podemos identificar simultaneamente polimorfismos nos nucleotídeos nt1762 (A por T) e nt1764 (G por A) do “Basal core promotor” (BCP) e no codão 28 na região do pré-core do HBV que codificam um codão stop, diminuindo a expressão de AgHBe. A mutação no codão 28 é a mais comum, resultando na ausência de produção de AgHBe, muito característica dos doentes crónicos AgHBe negativos. [32]

10.3.5 Sequenciação*

A sequenciação do HBV permite obter a sequência bidireccional do genoma do HBV determinando tanto o genótipo como a pesquisa de mutações que conduzem ao aparecimento da resistência à terapêutica. Permite poupar tempo, contudo em termos económicos é bastante dispendioso. [32]

10.4 Hepatite C

O vírus da hepatite C é um vírus envelopado de genoma RNA, pertencente à família *Flaviviridae*. A via de transmissão mais importante é a parenteral. O genoma deste vírus apresenta em elevado grau de variabilidade genética, tem duas zonas muito variáveis que codificam a proteína E2, região hipervariável 1 (HVR-1) e região hipervariável 2 (HVR-2). As zonas mais conservadas são a 5' UTR e a parte terminal da região 3' UTR.

A Hepatite C evolui para hepatite crónica em 80% dos casos. Os anticorpos anti-HCV surgem entre 15 dias a 6 meses após a infecção, podendo manter-se positivos por tempo indeterminado, mesmo após um tratamento efectivo. Sempre que um doente apresente um anti-HCV positivo deve pesquisar-se o RNA. [27, 31]

Se obtivermos uma amostra positiva quer por ELISA quer por quimioluminiscência, não podemos confirmar a infecção por HCV até executarmos um teste confirmatório.

10.4.1 Inno-Lia HCV*

O INNO-LiA™ HCV Score é um teste confirmatório, trata-se de um imunoensaio em linha, para a detecção de anticorpos contra os antígenos do HCV derivados da região do core, a região E2 hiper variável (HVR), da região NS3 helicase, das regiões NS4A, NS4B, e NS5A em soro ou plasma humano. [27]

10.4.2 Carga Viral HCV*

A carga viral é o parâmetro que melhor avalia a resposta à terapêutica. O limite de detecção da técnica é de 15 UI/ml.

10.4.3 Genótipo HCV*

A determinação do genótipo é extremamente importante que condiciona a escolha do tratamento e duração do mesmo. Dependendo do genótipo o clínico pode ser elucidado acerca da progressão da doença, uma vez que há genótipos que respondem melhor à terapêutica do que outros. [31]

10.4.4 Polimorfismo da IL28B*

A detecção do polimorfismo rs12979860 no gene humano da IL-28B e a diferenciação dos genótipos: homocigótico “wild-type” (C/C); heterocigótico (C/T) e o genótipo homocigótico mutado (T/T), influencia a terapêutica uma vez que o genótipo CC responde melhor ao tratamento. No entanto, nem todos os doentes com este genótipo conseguem resposta virológica rápida. A combinação do genótipo com o polimorfismo IL28B permite ao clínico a adopção do melhor esquema terapêutico. [34]

10.5 Hepatite Delta

O vírus da hepatite Delta (HDV) é um vírus RNA defectivo já que só se consegue replicar na presença do HBV. A infecção pode ocorrer em simultâneo com a infecção por HBV (co-infecção) ou ocorrer depois do indivíduo já ser portador de HBV (super-infecção).

Não existe vacina para este vírus, contudo como só causa infecção na presença de HBV, a vacina do HBV acaba por ser eficaz na prevenção da infecção por este vírus. [35]

No laboratório de virologia são determinados os anticorpos anti-delta total (IgG e

IgM) e anti-delta IgM.

10.5.1 Carga Viral HDV*

Em combinação com HBV, a infecção por HDV está associada a graves complicações como é a rápida progressão para cirrose hepática, o aumento da possibilidade de desenvolver carcinoma hepático, estando associada a elevadas taxas de mortalidade.

A carga viral é importante na avaliação da resposta à terapêutica, o limite de detecção da técnica é 30 cópias/ml.^[35]

10.6 Hepatite E

O vírus da hepatite E (HEV) é vírus de RNA, nú, pertencente à família *Caliciviridae*. A transmissão é oral-fecal. Os anticorpos surgem cerca de duas semanas após a infecção, e com o passar do tempo o título de IgM diminui à medida que vai aumentando o do IgG. A doença, em geral não é grave, excepto quando evolui para hepatite fulminante.^[36]

10.6.1 Carga Viral HEV*

Têm sido descritos alguns casos de hepatite fulminante em grávidas cujo agente etiológico detectado foi o HEV, tendo o CHUC uma maternidade faz todo o sentido a realização do teste.

O limite de detecção da técnica é 80 cópias/ml.^[36]

10.7 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é vírus de RNA, pertencente à família *Retroviridae*. O genoma do vírus é constituído por 3 genes principais e 6 reguladores. Os 3 genes principais são: o gene *env* que codifica as proteínas estruturais do envelope; o gene *gag* que codifica as proteínas da cápside, da nucleocápside e matriz, e o gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à replicação, transcriptase reversa, protease e integrase. A transmissão é por contacto directo com fluidos biológicos infectados.^[36]

No laboratório de virologia os kits utilizados, tanto quimioluminiscência como ELISA pesquisam o antigénio p24 do HIV e anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV2, contudo não fazem distinção entre os dois, sendo necessário recorrer a testes confirmatórios. Quando se tem uma amostra positiva quer por quimioluminiscência quer por ELISA, a amostra é sempre repetida, utilizando outra metodologia, por vezes há falsos positivos. Se a amostra for positiva por quimioluminiscência, a amostra é repetida por utilizando uma técnica de ELISA.

Mantendo o resultado, procede-se à realização de testes confirmatórios inno-lia HIV ou western blot.^[37,38]

10.8 Vírus Humano da Leucemia das Células T (HTLV)

O HTLV é um vírus de RNA, pertence à família *Retroviridae*, o seu genoma possui 3 genes *gag*, *env* e *pol* e uma região pX. A sua transmissão ocorre por contacto com linfócitos T infectados.^[39]

No laboratório de virologia são pesquisados os anticorpos anti-HTLV-I/II. Quando é obtido um resultado positivo, o seguimento a dar é semelhante ao do HIV, executa-se o western blot para confirmar e especificar se a infecção é devida a HTLV-I ou HTLV-II.

11. Outros parâmetros determinados nos dadores de sangue

11.1 Transcription Mediated Amplification (TMA)

A utilização deste ensaio permitiu diminuir o “período janela”, diminuindo a probabilidade de uma infecção por HIV, HBV ou HCV não ser detectada apesar de já existir. São poucos os casos em que apenas este teste é positivo.

Permite ao laboratório pesquisar RNA do HIV, HCV e DNA do HBV tanto de dadores de sangue como dadores cadáveres para recolha de córneas.^[29]

11.2 Sífilis

O agente etiológico da sífilis é uma bactéria *Treponema pallidum*, trata-se de uma doença de transmissão sexual (DST).

Este é um parâmetro obrigatório no rastreio aos dadores de sangue. Os testes realizados neste Laboratório destinam-se apenas ao screening dos dadores e são testes não treponémicos, ou seja pesquisam anticorpos e não antigénios específicos do microorganismo.^[40] São pesquisados anticorpos anti-*Treponema pallidum* do tipo IgG ou IgM.

11.3 Malária

O agente etiológico da malária é o *Plasmodium spp*, é transmitido ao homem pela picado do insecto *Anopheles*. As espécies patogénicas para o ser humano são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*.

Em casos raros, a infecção é adquirida através da inoculação directa de sangue infectado, por exposição accidental ou através da transfusão de sangue e componentes sanguíneos. Daí a necessidade de realizar o teste em dadores que tenham estado em zonas

endémicas do *Plasmodium*.

O primeiro caso de malária transmitida por transfusão foi descrito em 1911. O SSMT procedeu a um estudo entre 9 de Maio de 2008 e 15 de Agosto de 2009, identificando 718 dadores de risco entre 25.871 dadores, aos quais foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium*. Destes, 120 apresentaram um resultado positivo, representando 0.46% dos dadores inscritos nesse período. As amostras reactivas pelo teste imunoenzimático foram enviadas para o Centro Nacional de Microbiologia, no Instituto Carlos III, de Madrid, para estudo por técnicas de PCR.^[41]

No laboratório são pesquisados anticorpos para o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*.

12. Controlo de Qualidade

O objectivo da realização do controlo interno é assegurar a qualidade nos resultados fornecidos pelo Laboratório. As amostras de controlo de qualidade interno são processadas todos os dias, como se de um dador ou doente se tratasse, visam monitorizar o desempenho do Laboratório de virologia na rotina e assegurar padrões de qualidade.

Os resultados obtidos são introduzidos num programa informático, que automaticamente avalia os resultados de acordo com as médias e desvio-padrão. Funciona como uma ferramenta estatística que permite avaliar a performance do aparelho, e a presença de erros sistemáticos e/ou fortuitos. Se o controlo de qualidade interno estiver fora dos intervalos definidos, todos os resultados são invalidados. Mensalmente são tirados relatórios do controlo de qualidade interno para todos os parâmetros.

O Controlo de Qualidade Externo (CQE) permite a avaliação retrospectiva do desempenho, permitindo a comparação entre os resultados obtidos em Laboratórios diferentes, com conseqüente uniformização para verificar a qualidade dos resultados obtidos por um Laboratório.

A qualidade é controlada por Laboratórios independentes que fornecem aos Laboratórios participantes as amostras, estes devem efectuar as provas com os distintos reagentes utilizados nos diversos equipamentos, enviando os resultados dos mesmos.

A participação em planos de CQE podem ser considerados como um desafio para verificar a eficácia das Boas Práticas de Laboratório e aumenta a credibilidade do Laboratório, permitindo também uma melhoria do desempenho.^[42]

A virologia e a imunohematologia participam no programa UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (UK NEQAS). A imunohematologia participa

no Programa Controlo de Qualidade Externo Imunohematologia (PCQEI), é um procedimento para verificar a qualidade dos resultados obtidos por um Laboratório de Imunohematologia, sendo fornecido pelo IPST.

13. Casos clínicos

Doente 24 anos rotina pré-operatória apresentando os seguintes resultados:

Análise	Método	Resultado	Interpretação	Valores de Referência
VIROLOGIA				
HBs Ag	CMIA	0,36	Negativo	Negativo < 0.9 Positivo > 1.1 0.9 <= Indeterminado <= 1.1
HBc Ac	CMIA	10,49	Positivo	Negativo < 0.9 Positivo > 1.1 0.9 <= Indeterminado <= 1.1
HBc Ac (IgM)	CMIA	0,12	Negativo	Negativo < 0.8 Positivo > 1.2 0.8 <= Indeterminado <= 1.2
HBs Ac (Titulo)	CMIA	>1000.0 UI/L		
HBe Ag	CMIA	0,39	Negativo	Negativo < 0.9 Positivo > 1.1 0.9 <= Indeterminado <= 1.1
HBe Ac	CMIA	2,34	Positivo	Negativo < 0.9 Positivo > 1.1 0.9 <= Indeterminado <= 1.1
HIV 1+2 Ag/ Ac	CMIA	546,89	Positivo	Negativo < 0.9 Positivo > 1.1 0.9 <= Indeterminado <= 1.1
Inno-Lia HIV I/ II		Positivo HIV 1		

A doente está vacinada para a hepatite B, confirmou-se a infecção por HIV-I como se mostra nas imagens seguintes.



Imagem 1: Tira de nitrocelulose Inno-Lia HIV.

Line Reactivity:											
Line	STREP	3+	1+	+/-	sgp120	gp41	p31	p24	p17	sgp105	gp36
Rating	-	3+	1+	+/-	3+	3+	-	3+	2+	-	-

Imagem 2: Interpretação automática do Inno-Lia HIV.

Doente com múltiplas infecções seguido na consulta de infecciosas, apresentando os seguintes resultados:

Análise	Método	Resultado	Interpretação	Valores de Referência
VIROLOGIA				
HBs Ag	CMIA	3460,62	Positivo	Negativo<0.9 Positivo>1.1 0.9<=Indeterminado<=1.1
HBc Ac	CMIA	11,50	Positivo	Negativo<0.9 Positivo>1.1 0.9<=Indeterminado<=1.1
HBs Ac (Titulo)	CMIA	0,00 UI/L		
HBe Ag	CMIA	0,23	Negativo	Negativo<0.9 Positivo>1.1 0.9<=Indeterminado<=1.1
HBe Ac	CMIA	68,03	Positivo	Negativo<0.9 Positivo>1.1 0.9<=Indeterminado<=1.1
Ac Delta	EIA	454,55	Positivo	Negativo<0.9 Positivo>1.1 0.9>=Indeterminado<=1.1
Ac Delta IgM	EIA	3,37	Positivo	Negativo<0.9 Positivo>1.1 0.9<=Indeterminado<=1.1
HAV Ac	CMIA	11,33	Positivo	Negativo<0.9 Positivo>1.1 0.9<=Indeterminado<=1.1

BIOLOGIA MOLECULAR

RNA HCV Qualitativo (Tempo real)	Positivo		
Genotipo HCV	3a		
Teste Resist. Terapeutica HBV	Indeterminavel		
PCR - HBV Qualitativo (Tempo real)	Positivo		
Genotipo HBV	Indeterminavel		
Carga viral baixa.			
HBV-DNA quantitativo (PCR tempo real)	20 UI/ml	Positivo	Negativo=0 Positivo>=20 1<=Duvidoso<20
HCV-RNA quantitativo (PCR tempo real)	4780 UI/ml	Positivo	Negativo=0 Positivo>=15 1<=Duvidoso<15

O doente tem uma hepatite B crónica com superinfecção com HDV, e uma hepatite C. Inicialmente este doente apresentava apenas uma hepatite B, entretanto adquiriu infecção por HDV e HCV. O doente encontra-se em tratamento, o tratamento para a hepatite C foi iniciado recentemente, informação disponibilizada na requisição. Seria interessante observar as análises deste, num intervalo de tempo próximo, contudo o doente ainda não regressou ao hospital.

14. Conclusão

O estágio foi realizado no meu ambiente de trabalho, o que foi extremamente enriquecedor porque foi-me possível questionar tudo aquilo que faço e aprender novas técnicas que até então desconhecia. Foi-me dada a possibilidade de integrar um novo sector, a biologia molecular doentes onde estão sempre a ser implementadas novas técnicas.

O serviço de sangue é uma área das análises clínicas pouco conhecida mas extremamente aliciante, e com uma grande responsabilidade inerente. O SSMT por estar num hospital central tem situações de emergência quase todos os dias, onde as unidades de sangue têm de seguir sem provas de compatibilidade dada a gravidade das situações.

Em suma, passei a olhar para o serviço que me acolhe há oito anos com outros olhos.

15. Bibliografia

- 1- Despacho 262/97 de 30 de Setembro.
- 2- Hawkins R. Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process. *Ann Lab Med.* 2012 Jan; 32(1): 5-16.
- 3- Imuno-hematologia recomendações 2ª edição, Lisboa: Centro Regional de Sangue de Lisboa; 2008.
- 4- Issit PD. *Applied blood group serology.* 3rd ed. Miami: Montgomery Scientific; 1985.
- 5- Yazer H, Hosseini-Maaf B, Olsson L. Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles. *Curr Opin Hematol.* 2008 Nov; 15(6): 618-24.
- 6- Quinley ED. *Immuno-hematology Principles & Practice.* 3rd ed. Washington: Wolters Kluwer; 1998.
- 7- Chiaroni J, Lauroua P, Roubinet F et al. Aide à la decision en immuno-hematology interpretation du groupage sanguine ABO et de ses difficultes. *Transfus Clin Biol* 2000; 7: 84-95.
- 8- Daniels G, Flegel A, Fletcher A, et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Cape Town Report. *Vox Sang.* 2007; 92: 250-253.
- 9- Reid E. The ISBT 700 series of low-incidence and 901 series of high-incidence blood group antigens. *Immuno-hematology.* 2011; 27(4): 131-5.
- 10- Jaben E, Jacop E, D'Souza A et al. Clinically significant anti-A1 in a presumed ABO-identical hematopoietic stem cell transplant recipient: a case report. *Transfusion.* 2013 Jan; 53(1): 202-5.
- 11- Roubinet F, Mannessier L, Chiaroni J et al. Aide à la decision en immuno-hematology: recherche des anticorps anti-érythrocytaires (RAI) *Trans Clin Biol* 2000; 7: 513-518.
- 12- Cianciarullo M, Ceccon M, Vaz F. Prevalence of immuno-hematologic tests at birth and the incidence of hemolytic disease in the newborn. *Rev Assoc Med Bras.* 2003 Jan-Mar; 49(1): 45-53.
- 13- Cianciarullo M, Ceccon M, Vaz F. Doença hemolítica neonatal: antígenos e anticorpos envolvidos. *Pediatria* 2001; 23(3): 251-7.
- 14- Kumpel B. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis *Transfusion.* 2006 Sep; 46(9): 1652-6.

- 15- Andrade L, Pimenta P, Sargento C et al. *Medicina Interna* 1999; 6(1): 38-40.
- 16- *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013; 35(2): 77-88.
- 17- Moulds J. Future of molecular testing for red blood cell antigens. *Clin Lab Med.* 2010 Jun; 30(2): 419-29.
- 18- Decreto-Lei 100/2011 de 29 de Setembro.
- 19- Tendulkar A, Rajadhyaksha S. Comparison of plateletpheresis on three continuous flow cell separators *Asian J Transfus Sci.* 2009 July; 3(2): 73-77.
- 20- Weinigel C, Rummler S, Barz D. The effect of increased centrifugation temperature on the quality of red-blood-cell concentrates of automated whole blood processing. *Vox Sang.* 2013 May 11. doi: 10.1111/vox.12040.
- 21- Thomas S, Beard M, Garwood M, Callaert M et al. Blood components from whole blood using the Atreus processing system. *Transfusion.* 2008 Dec; 48(12): 2515-24
- 22- Conferência de Consenso Uso de Sangue e Derivados Centro Hospitalar do Porto consultado em www.asst.minsaude.pt a 03 de Agosto de 2013.
- 23- Decreto-Lei 267/2007 de 24 de Julho.
- 24- International Forum, Testing for D weak. *Vox Sanguinis* (2006) 90: 140-153.
- 25- Relatório da ASST consultado em www.asst.min-saude.pt a 03 de agosto de 2013
- 26- Park H, Lee Y, Seong W, Lee H et al. Comparison of 3 automated immunoassays for detection of anti-hepatitis A virus immunoglobulin M in a tertiary care hospital. *Ann Lab Med.* 2013 Mar; 33(2): 121-4.
- 27- Jonas G, Pelzer C, Beckert C, et al. Performance characteristics of the ARCHITECT anti-HCV assay. *J Clin Virol.* 2005 Oct; 34(2): 97-103.
- 28- Shinkai N, Matsuura K, Sugauch F et al. Application of a newly-developed high sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBs Ag seroclearance. *Clin Microbiol.* 2013 Aug; 14 (1): 32-35.
- 29- Xiao X, Zhai J, Zeng J et al. Comparative evaluation of a triplex nucleic acid test for detection of HBV DNA, HCV RNA, and HIV-1 RNA, with the Procleix Tigris System. *J Virol Methods.* 2013 Feb; 187(2): 357-61.
- 30- Pyne T, Vest L, Clement J, et al. Comparison of three Roche hepatitis B virus viral load assay formats. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul; 50(7): 2337-42.
- 31- Nakatani M, Santos A, Riediger N, et al. Comparative performance evaluation of hepatitis C virus genotyping based on the 5' untranslated region versus partial sequencing of the NS5B region of brazilian patients with chronic hepatitis C. *Virol J.* 2011 Oct 3; 8: 459.

- 32-Kan Z, Zheng H, Liu X, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res.* 2013 Aug; 6: 1-12.
- 33-Alawi F, Robertson W, Lepage K et al. The reliability of HBV core antibody in serological screening for hepatitis B virus. *Pathology.* 2013 Aug; 45(5): 501-5.
- 34-Abdo A, Al-Ahdal N, Khalid S et al. IL28B polymorphisms predict the virological response to standard therapy in patients with chronic hepatitis C virus genotype 4 infection. *Hepatology Int.* 2013 Feb 8; 7(2): 533-538.
- 35-Smedile A, Niro G, Rizzetto M. Detection of serum HDV RNA by RT-PCR. *Methods Mol Med.* 2004; 95: 85-93.
- 36-Candido A, Taffon S, Chionne P et al. Diagnosis of HEV infection by serological and real-time PCR assays: a study on acute non-A-C hepatitis collected from 2004 to 2010 in Italy. *BMC Res Notes.* 2012 Jun; 15(5): 297-299.
- 37-Chavez P, Wesolowski L, Patel P et al. Evaluation of the performance of the Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo Assay. *J Clin Virol.* 2011 Dec; 52 Suppl 1: S51-5.
- 38-Wesolowski G, Delaney P, Meyer A et al. Use of rapid HIV assays as supplemental tests in specimens with repeatedly reactive screening immunoassay results not confirmed by HIV-1 Western blot. *J Clin Virol.* 2013 Sep; 58 (1): 240-4.
- 39-Ma Y, Zheng S, Wang N et al. Epidemiological analysis of HTLV-1 and HTLV-2 infection among different population in Central China. *PLoS One.* 2013 Jun 24; 8(6): 66-79.
- 40-Jakopanec I, Grjibovski M, Nilsen Ø et al. Syphilis epidemiology in Norway, 1992-2008: resurgence among men who have sex with men. *BMC Infect Dis.* 2010 Apr; 29(10): 5-10.
- 41-Pereira B, Nazareth C, Malcata L et al. Infecções parasitárias transmitidas por transfusão de sangue. Qual o risco nos países não endémicos? *Acta Med Port* 2011; 24: 897-906.
- 42-Middle G, Libeer C, Malakhov V et al. Characterisation and evaluation of external quality assessment scheme serum. Discussion paper from the European External Quality Assessment (EQA) Organisers Working Group C. *Clin Chem Lab Med.* 1998 Feb; 36(2): 119-30.

