Relatório de estágio

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

2010/2012

· U C ·

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Trabalho realizado por: Catarina Alexandra Delgado de Sousa

Orientadora: Dra. Maria Manuela da Silva Paulino
Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas
Diretora Técnica do Laboratório Clinova em Torres Novas

Local do estágio: Laboratório Clinova, Torres Novas
Período de estágio: Outubro de 2011 a Maio de 2012
Duração: 600 horas

Índice

AGRADECIMENTOS VI

ABREVIATURAS VII

RESUMO IX

ABSTRACT IX

I. INTRODUÇÃO 1

II. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO 2

III. CONTROLO DE QUALIDADE 3

1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO (CQI) 3
2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE (AEQ) 3

IV. HEMATOLOGIA 4

1. CONTAGEM DE CÉLULAS SANGUÍNEAS 4

1.1. Leucócitos 5

1.2. Eritrócitos 6

1.3. Hemoglobina 7

1.4. Hematócrito 7

1.5. Constantes eritrocitárias 7

1.5.1. Volume Globular Médio (VGM) 7

1.5.2. Hemoglobina Globular Média (HGM) 7

1.5.3. Concentração da Hemoglobina Globular Média (CHGM) 8

1.5.4. Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (RDW) 8

1.6. Reticulócitos 8

1.7. Plaquetas 9

2. ESTUDO MORFOLÓGICO DO SANGUE PERIFÉRICO 10

2.1. Eritrócitos 10

2.2. Leucócitos 12

2.2.1. Neutrófilos 12

2.2.2. Eosinófilos 12

2.2.3. Basófilos 12

2.2.4. Monócitos 12

2.2.5. Linfócitos 12

2.3. Plaquetas *13*
3. TALASSEMIAS E HEMOGLOBINOPATIAS 13
3.1. Pesquisa de células falciformes *15*
4. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO 15
5. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA 16
5.1. Tempo de protrombina *19*
5.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada *20*
5.3. Fibrinogénio *20*
6. IMUNOHEMATOLOGIA 21
6.1. Grupo Sanguíneo *21*
6.1.1. Sistema ABO 21
6.1.2. Sistema Rh 22
6.2. Teste de Coombs *22*
6.2.1. Teste de Coombs direto 23
6.2.2. Teste de Coombs indireto 23
V. IMUNOLOGIA 24
1. IMUNOENSAIOS 24
1.3. Ensaios de aglutinação de partículas *24*
1.4. Imunoensaios enzimáticos *25*
2. MARCADORES DE ANEMIA 27
2.1. Ácido Fólico *27*
2.2. Vitamina B_{12} *27*
2.3. Ferritina *28*
3. ESTUDO DA FUNÇÃO ENDÓCRINA 28
3.1. Hormonas da função tiroideia *28*
3.1.1. TSH 28
3.1.2. Hormonas tiroideias 29
3.1.3. Anticorpos antitiroideus 30
3.2. Paratormona *30*
3.3. Hormonas da função gonadal *31*
3.3.1. FSH e LH 31
3.3.2. Estrogénios 32
3.3.3. Progesterona 33

3.3.4. Testosterona 34
3.4. Prolactina *34*
3.5. Gonadotrofina coriónica humana (hCG) *35*
4. MARCADORES TUMORAIS 35
4.1. α-Fetoproteína *36*
4.2. CEA *36*
4.3. CA 19-9 ..... *36*
4.4. CA 125 ..... *36*
4.5. CA 15-3 ..... *37*
4.6. PSA total *37*
4.7. PSA livre *37*
4.8. Tiroglobulina *38*
5. SEROLOGIA DE INFEÇÕES VÍRICAS 38
5.1. Hepatite A *38*
5.2. Hepatite B *39*
5.3. Hepatite C *40*
5.4. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2) *41*
5.5. Vírus de Epstein-Barr *41*
5.6. Citomegalovírus *42*
5.7. Vírus da Rubéola *43*
6. SEROLOGIA DE INFEÇÕES PARASITÁRIAS 43
6.1. Toxoplasmose *43*
7. SEROLOGIA DE INFEÇÕES BACTERIANAS 44
7.1. Febre tifóide e febre paratifóide *44*
7.2. Rickettsioses *45*
7.3. Brucelose *46*
7.4. Sífilis *47*
8. REAÇÃO DE WALLER-ROSE 48
9. IMUNOGLOBULINA E TOTAL 48
CONCLUSÕES **49**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **51**
ANEXOS **53**

Lista de Figuras

Figura 1 – Sysmex XT-2000i 3
Figura 2 – Guia simplificado para o diagnóstico de anemias 9
Figura 3 – Sangue periférico mostrando eritrócitos normais 10
Figura 4 – Sangue periférico mostrando dois neutrófilos, um eosinófilo, um basófilo, um monócito e um linfócito 13
Figura 5 – ADAMS HA-8160 14
Figura 6 – Alifax Test 1 16
Figura 7 – Visão clássica da cascata da coagulação 17
Figura 8 – Esquema da coagulação baseado no modelo celular 18
Figura 9 – Sysmex CA-500 19
Figura 10 – Immulite 2000 26
Figura 11 – ADVIA Centaur 26
Figura 12 – VIDAS 27
Figura 13 – Ciclo menstrual 31
Figura 14 – A – Curso serológico da hepatite B aguda para a cura 40
B – Curso serológico da hepatite B para a cronicidade 40

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Equipamentos e respetivos fornecedores utilizados no Clinova 2
Tabela 2 – Interpretação de alterações no leucograma 6
Tabela 3 – Interpretação de alterações nos eritrócitos 11
Tabela 4 – Grupos sanguíneos e respetivas caraterísticas 22
Tabela 5 – Parâmetros doseados na secção de Imunologia e respetivos equipamentos e métodos 26
Tabela 6 – Causas de anomalias na produção de gonadotrofinas 32
Tabela 7 – Infeções por riquétsias detetáveis pela reação de Weil-Félix 47

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Dra. Manuela Paulino, por me permitir fazer parte de uma equipa de profissionais competentes, como é a equipa do laboratório Clinova, e pela sua valiosa orientação, encorajamento e incentivo.

Às minhas colegas do laboratório Clinova, pela sua compreensão e ajuda, sem as quais a realização deste mestrado não teria sido possível.

Aos colegas do mestrado em análises clínicas, pelo companheirismo, entreajuda, e troca de experiências. Tornaram esta jornada muito mais agradável.

Ao grupo de docentes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e a todos os professores convidados, pela sua disponibilidade e partilha de conhecimentos. Agradeço especialmente à coordenadora de curso, a Professora Leonor Almeida, pelo seu acolhimento, simpatia e dedicação.

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e carinho.

Ao meu marido, pela enorme paciência, apoio e carinho, e por todas as minhas ausências…

Abreviaturas

AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AgHBe	Antigénio "e" do núcleo do vírus da hepatite B
AgHBs	Antigénio de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HBc	Anticorpos contra o antigénio "c" do núcleo do vírus da hepatite B
Anti-HBe	Anticorpos contra o antigénio "e" do núcleo do vírus da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpos contra o antigénio de superfície do vírus da hepatite B
ATG	Anticorpos Antitiroglobulina
ATPO	Anticorpos Antiperoxidase
AVK	Antivitamina K
CHGM	Concentração da Hemoglobina Globular Média
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DHEA	Dihidroepiandrosterona
EBV	Vírus de Epstein-Barr
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELFA	*Enzyme Linked Fluorescence ImmunoAssay*
FI	Fator intrínseco
fPS	PSA livre
FR	Fator Reumatóide
FSH	Hormona Folículoestimulante
FT	Fator Tecidual
FT_3	T_3 Livre
FT_4	T_4 Livre
FVIIa/FT	Complexo Fator VII ativado/Fator Tecidual
GnRH	Hormona libertadora das gonadotrofinas
GV	Glóbulo Vermelho
HAV	Vírus da Hepatite A
Hb	Hemoglobina
HbA_1	Hemoglobina A_1
HbA_2	Hemoglobina A_2
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
HBV	Vírus da Hepatite B
hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
HCT	Hematócrito
HCV	Vírus da Hepatite C

HGM	Hemoglobina Globular Média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INR	*International Normalized Ratio*
LH	Hormona Luteinizante
MI	Mononucleose Infeciosa
pg	Picogramas
PLT	Plaquetas
PTH	Paratormona
RBC	Glóbulos vermelhos
RDW	*Red Cell Distribution Width*
RET	Reticulócitos
Rh	Sistema Rhesus
Rh+/-	Sistema Rhesus Positivo/Negativo
rpm	Rotações por minuto
RPR	*Rapid Plasma Reagin*
SHBG	*Sex Hormone Binding Globulin*
SIDA	Síndroma da Imunodeficiência Adquirida
T_3	Triiodotironina
T_4	Tiroxina
TBG	*Thyroxin Binding Globulin*
TP	Tempo de Protrombina
TPHA	Treponema pallidum Hemagglution Assay
TRH	Hormona Libertadora da Tirotrofina
TSH	Tirotrofina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory
VGM	Volume Globular Médio
VS	Velocidade de Sedimentação

Resumo

Este relatório de estágio do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tem por objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio efetuado no laboratório Clinova. O estágio envolveu as diferentes áreas laboratoriais, nomeadamente a Bioquímica Clínica, a Microbiologia, a Hematologia e a Imunologia, estando este relatório centrado nas áreas de Hematologia e Imunologia. É descrita a importância clínica das análises efetuadas, as metodologias utilizadas na sua execução e os fundamentos, o material e equipamentos utilizados e a respetiva interpretação de resultados, assim como os controlos de qualidade efetuados.

Abstract

This internship report for the Clinical Analysis Masters at "Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra" pretends to describe all the activities in which I was involved during my internship at Clinova laboratory. Although it involved different laboratorial areas, such as Biochemistry, Microbiology, Haematology and Immunology, this report is focused on Haematology and Immunology. It describes the clinical relevance of each test, the methods used for analysis and its fundaments, as well as the equipment involved and results evaluation, and the use of internal and external quality controls.

I. Introdução

O presente relatório diz respeito ao estágio em análises clínicas que integra o Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio foi realizado no laboratório Clinova em Torres Novas, e teve a duração de 600 horas.

Inicialmente o estágio envolveu a aprendizagem das normas de higiene e segurança do laboratório, do atendimento aos utentes e das normas de colheitas de amostras, as quais foram postas em prática ao longo de todo o estágio. No que diz respeito à realização das análises foram abrangidas todas as secções do laboratório, nomeadamente a Microbiologia, a Bioquímica, a Hematologia e a Imunologia. Este relatório centra-se nas atividades desenvolvidas nas áreas da Hematologia e da Imunologia.

Na área da Microbiologia o estágio envolveu a realização de análises bacteriológicas, parasitológicas e micológicas de diversos produtos biológicos, nomeadamente: urinas, exsudados vaginais, uretrais, orofaríngeos, nasais, auriculares, amostras de pus, esperma, expetoração, fezes, cabelos, unhas e raspados da pele. Estive envolvida em todo o processo, desde a colheita de amostras, processamento, isolamento e identificação dos agentes patogénicos envolvidos, realização e interpretação de antibiogramas, até à interpretação e validação dos resultados obtidos.

Nas áreas da Bioquímica, Hematologia e Imunologia tive oportunidade de aprofundar os fundamentos teóricos dos métodos analíticos utilizados e aplicá-los à prática laboratorial, e aprender os procedimentos de operação, calibração, controlo e manutenção dos equipamentos utilizados, das técnicas manuais e do material e reagentes envolvidos. Ao longo do estágio fui desempenhando as diversas funções técnico-científicas que fazem parte destas áreas, adquirindo autonomia na realização dessas tarefas, desde o processamento das amostras até à validação do resultado final.

O principal objetivo deste estágio foi a obtenção de competências para o exercício profissional das Análises Clínicas, na realização, validação e interpretação de técnicas laboratoriais e seus resultados, aplicadas à prevenção, diagnóstico e monitorização da doença, de forma a poderem ser desempenhadas com rigor em laboratórios públicos ou privados.

II. Caracterização do Laboratório de estágio

O estágio foi realizado no laboratório Clinova, situado no Edifício Parque, Largo D. Diogo Fernandes de Almeida, numa zona central da cidade de Torres Novas. A direção técnica encontra-se a cargo da Dra. Manuela Paulino, farmacêutica especialista em análises clínicas.

O Clinova apresenta umas instalações amplas e muito funcionais, bem iluminadas, climatizadas, e dotadas de música ambiente, de forma a garantir a satisfação de utentes e funcionários. Encontra-se na sua maioria automatizado, e totalmente informatizado. Na tabela 1 encontra-se a lista de equipamentos utilizados. É composto por uma equipa de profissionais competentes e habilitados, que inclui: 1 diretora técnica, 1 especialista em análises clínicas, 2 técnicas superiores, 2 técnicas de análises clínicas, 3 auxiliares e 3 administrativas.

Além do laboratório central existem nove postos de colheitas em localidades próximas. O laboratório efetua ainda análises para hospitais, lares de idosos, domicílios e medicina do trabalho, possuindo uma média de 150 utentes diários.

Tabela 1 – Equipamentos e respetivos fornecedores utilizados no laboratório Clinova.

Secção	Equipamento	Fornecedor
Bioquímica	Dimension RXL	Siemens
	Hydrasis Sebia	Phadia
Hematologia	Syxmex XT-2000i	Emílio de Azevedo Campos
	Sysmex CA-500	Siemens
	Adams HA-8160	Ménarini
	Alifax Test 1	Batista Marques
Microbiologia	Aution Max AX-4280	Ménarini
	MicroScan AutoScan 4	Siemens
Imunologia	ADVIA Centaur	Siemens
	Immulite 2000	Siemens
	VIDAS	BioMérieux

O laboratório Clinova encontra-se certificado pela Norma NP EN ISO 9001:2008. A Política da Qualidade envolve o desenvolvimento e aperfeiçoamento contínuo das técnicas e equipamentos, bem como a formação contínua de todos os colaboradores, por forma a garantir a constante melhoria na precisão científica de todos os resultados obtidos. Pretende-se fundamentalmente servir o utente, mantendo para isso três regras padrão: o respeito, a confiança e a honestidade em todo o trabalho d

esenvolvido.

III. Controlo de Qualidade

1. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O CQI permite avaliar a precisão, variabilidade e reprodutibilidade dos métodos usados, detetando erros aleatórios e permitindo a sua correção[1].

Nas secções de bioquímica, hematologia e imunologia do Clinova o CQI é efetuado diariamente para todos os parâmetros, antes do processamento das amostras. Para as análises quantitativas existem geralmente três níveis de controlo, sendo realizados alternadamente, um por dia. Para as análises qualitativas alternam-se os controlos positivo e negativo. A aceitação dos controlos baseia-se nos valores das bulas dos controlos, e na interpretação de cartas de controlo (cartas de Levey-Jennings) tendo em conta as regras de Westgard. Os limites de aceitação são de ±3SD. Quando algum resultado se encontra fora de controlo procede-se à ação corretiva, seja através de calibrações, verificação da estabilidade de reagentes ou controlos, ou outras de natureza técnica. É então efetuado novo controlo, sendo as amostras analisadas apenas após verificação da sua conformidade. Quando existe mudança de lote de reagentes é efetuada a respetiva calibração e são realizados todos os níveis de controlo, de forma a garantir a qualidade do novo reagente e dos resultados obtidos.

Na microbiologia é efetuado semanalmente o controlo da biocontaminação das superfícies de trabalho e da estufa, através da utilização de placas de gelose de controlo microbiológico. O CQI do equipamento dos antibiogramas é efetuado mensalmente, através da realização de identificação de uma amostra de controlo externo cujo agente patogénico já é conhecido.

2. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

A AEQ consiste na avaliação da performance do método. Permite ao laboratório verificar se os seus resultados são consistentes com os de outros laboratórios usando os mesmos métodos, ou métodos similares, confirmando que estão a ser utilizados corretamente[1].

Nas secções de bioquímica, hematologia e imunologia do Clinova o programa utilizado para a AEQ é o RIQAS (Randox, Irlanda). É realizado um controlo mensal para cada parâmetro analisado no laboratório, excetuando as técnicas manuais. Caso o relatório recebido contenha um resultado inaceitável é então investigada a possível causa, procedendo-se à respetiva ação corretiva. Na microbiologia é efetuado o controlo mensal de parasitologia e bacteriologia da AEFA (Associação Espanhola de Farmacêuticos Analistas),

efetuando-se a identificação dos microrganismos, e o respetivo antibiograma para a AEQ de bacteriologia.

IV. Hematologia

A secção de hematologia do laboratório Clinova encontra-se praticamente toda automatizada, com exceção da imunohematologia que envolve a realização de técnicas manuais. Durante o estágio em hematologia obtive formação em todos os equipamentos utilizados, ficando responsável pela sua preparação diária. Esta envolveu a verificação de reagentes, realização de calibrações e controlos diários, e manutenções. Fiquei ainda responsável pela realização das técnicas manuais de imunohematologia, após a respetiva formação. Ao longo do tempo fui consolidando os conhecimentos teóricos adquiridos durante o mestrado em análises clínicas, o que me permitiu efetuar a validação dos resultados obtidos.

A Hematologia inclui os estudos das células sanguíneas e da coagulação. Engloba a análise da concentração, estrutura e função das células; os seus precursores na medula óssea; os constituintes químicos do plasma ou soro ligados à estrutura e função das células sanguíneas; e as plaquetas e proteínas envolvidas na coagulação[1]. Neste capítulo são referidas as análises efetuadas na secção de hematologia do laboratório Clinova, a sua importância clínica e forma de diagnóstico laboratorial, assim como o respetivo equipamento e método utilizados. Em anexo I apresentam-se os valores de referência dessas análises.

1. Contagem de células sanguíneas

A contagem das células sanguíneas é efetuada através da realização do hemograma, um dos exames mais pedidos na prática quotidiana. O hemograma compreende a contagem dos elementos figurados do sangue (glóbulos vermelhos, brancos, plaquetas e eventualmente reticulócitos), das diferentes categorias de glóbulos brancos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos), e o cálculo dos índices eritrocitários (VGM, HGM e CHGM) a partir do doseamento da hemoglobina e do hematócrito[2].

Equipamento e método

Figura 1 – Sysmex XT-2000i[3].

A contagem do hemograma é efetuada no Syxmex XT-2000i (Fig. 1). Este autoanalisador utiliza os seguintes métodos: citometria de fluxo; focagem hidrodinâmica; e o método da SLS-hemoglobina. As determinações são

efetuadas em sangue total em EDTA. Em anexo II apresenta-se um resultado obtido neste equipamento.

A contagem de leucócitos é efetuada por **citometria de fluxo**. Este método analisa as características químicas e físicas das células em suspensão, à medida que passam num fluxo laminar. Um laser semicondutor é emitido e atravessa o fluxo de células, ocorrendo dispersão da luz em várias direções. Diferentes detetores são apontados ao local atravessado pelo feixe de luz, convertendo a luz em pulsos elétricos. Consoante o tipo de dispersão de luz, diferentes características são detetadas: *Forward Scatter* (dispersão frontal) deteta o tamanho celular; *Side Scatter* (dispersão lateral) a complexidade celular; e *Side Fluorescence* (fluorescência lateral) a quantidade de ácidos nucleicos[3].

A contagem de eritrócitos e plaquetas é efetuada por **focagem hidrodinâmica**. Após a injeção da amostra as células são rodeadas por uma solução salina, que garante um alinhamento através do orifício de deteção mantendo-as na posição central do fluxo. A amostra passa então para o tubo de captura que não permite a recirculação das células, evitando a formação de falsos pulsos. A intensidade dos pulsos elétricos de cada célula analisada é proporcional ao seu volume. O hematócrito é determinado com base na contagem dos eritrócitos e no volume detetado para cada um deles[3].

A determinação da hemoglobina é feita pelo **método da SLS-hemoglobina**. É utilizado o surfactante laurilsulfato de sódio (SLS), evitando o uso de cianeto. A reação ocorre pela seguinte ordem: hemólise dos eritrócitos; alteração da conformação da molécula de globina; oxidação do ferro; e formação do complexo SLS-hemoglobina. A quantificação é feita pela leitura da absorvância a 555nm[3].

1.1. Leucócitos

Os leucócitos formam a primeira linha de defesa do corpo contra microrganismos invasores. Os neutrófilos e os monócitos respondem através do processo da fagocitose, enquanto os linfócitos produzem principalmente anticorpos. A presença de alterações no quadro leucocitário normal pode assim indicar uma resposta inespecífica às infeções bacterianas ou virais. Pode, no entanto, fornecer também orientações diagnósticas para certas doenças específicas, benignas ou malignas[4].

Diagnóstico laboratorial

A contagem dos leucócitos do sangue periférico é dada em valor absoluto e em percentagem. Inclui os polimorfonucleares ou granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os mononucleares (linfócitos e monócitos)[4]. As anomalias na contagem dos

leucócitos podem estar associadas a diversas patologias. Na tabela 2 escontram-se descritas as alterações mais frequentes, e as possíveis causas.

Tabela 2 – Interpretação de alterações no leucograma[2].

Parâmetro	Alteração	Designação	Possíveis causas
Neutrófilos	Aumento	Neutrofilia	Infeções bacterianas, inflamações, necrose muscular aguda e tabagismo.
	Diminuição	Neutropenia	Profunda: Agranulocitose medicamentosa e leucemia aguda. Moderada: causa medicamentosa, tóxica ou viral. Moderada crónica: Síndroma de Felty (frequente no lúpus e doenças endócrinas).
Eosinófilos	Aumento	Eosinofilia	Alergias, eczema, intolerâncias medicamentosas e parasitoses.
Basófilos	Aumento	Basofilia	Leucemia mieloide crónica, policitemia vera, mixedema, varicela, varíola e colite ulcerativa.
Linfócitos	Aumento	Linfocitose	Doenças infeciosas: brucelose, febre tifoide, hepatite viral, varicela e rubéola. No adulto pode indicar leucemia linfoide crónica.
Monócitos	Aumento	Monocitose	Recuperação das neutropenias medicamentosas, fase inicial de doenças virais ou parasitárias e decurso de anemias sideroblásticas.

No Clinova, sempre que existe algum parâmetro fora dos valores de referência e/ou o analisador apresente uma mensagem de alerta, é efetuada a repetição do hemograma para confirmação. A observação do esfregaço de sangue periférico (Cap. 2) é efectuada em caso de alterações acentuadas.

1.2. Eritrócitos

Os eritrócitos são as mais abundantes de todas as células do organismo, necessárias para o suprimento de oxigénio aos tecidos. O eritrócito transporta a hemoglobina, cuja função é o transporte do oxigénio e do dióxido de carbono, mantendo-a no seu estado funcional[1].

Existe um equilíbrio entre a libertação de eritrócitos para o sangue e a sua remoção. Ocorre anemia quando a remoção sofre um aumento que não pode ser compensado pelo aumento da produção, quando a libertação de eritrócitos para o sangue está diminuída, ou ainda quando ambos os processos coexistem[1].

1.3. Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína complexa que consiste numa unidade heme (um complexo de um átomo de ferro no interior de quatro estruturas porfirínicas) e uma unidade de globina (dois pares de cadeias polipeptídicas; um par de cadeias α e um par de cadeias β). A principal função da hemoglobina é o transporte do oxigénio[4].

O teor total de hemoglobina no sangue depende principalmente do número de eritrócitos e, em menor grau, da quantidade de hemoglobina existente em cada eritrócito. Um baixo valor de hemoglobina está associado a anemia[4].

1.4. Hematócrito

O hematócrito consiste na relação entre o volume dos eritrócitos e o volume de sangue total. É definido como a percentagem de eritrócitos numa massa de sangue, após centrifugação. Sendo o sangue total constituído essencialmente por eritrócitos e plasma, a percentagem de eritrócitos sedimentados fornece uma estimativa indireta do número de eritrócitos/dL de sangue total. Por conseguinte, o hematócrito depende principalmente do número de eritrócitos, embora também seja afetado pelo tamanho médio das células[4].

1.5. Constantes eritrocitárias

A partir do número de eritrócitos, da hemoglobina e do hematócrito é possível calcular índices globulares ou constantes eritrocitárias. Estas fornecem informação sobre o tamanho e conteúdo em hemoglobina dos eritrócitos, sendo de grande utilidade na caracterização morfológica de anemias. Estes índices são fornecidos pelo autoanalisador[4].

1.5.1. Volume Globular Médio (VGM)

$$\text{VGM (fL)} = \frac{\text{Hematócrito(\%)} \times 10}{\text{N° de GVs } (10^6/\text{mm}^3)}$$

Corresponde à razão entre o volume ocupado pelos GVs e o nº total destes, fornecendo uma ideia do tamanho do eritrócito médio. Valores baixos de VGM são indicativos de microcitose e valores elevados são indicativos de macrocitose[4].

1.5.2. Hemoglobina Globular Média (HGM)

$$\text{HGM (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina (g/dL)} \times 10}{\text{N° de GVs } (10^6/\text{mm}^3)}$$

Expressa a quantidade de hemoglobina que existe em média no eritrócito, sendo calculada através da razão entre a hemoglobina e o número de eritrócitos. A HGM é influenciada pelo tamanho dos eritrócitos e pela quantidade de hemoglobina em relação ao tamanho da célula. Um valor baixo de HGM

indica hipocromia e está normalmente associado a microcitose; um valor elevado está associado a macrocitose[4].

1.5.3. Concentração da Hemoglobina Globular Média (CHGM)

$$CHGM\ (g/dL) = \frac{HGB\ (g/dL) \times 100}{HCT\ (\%)}$$

Representa a concentração média de hemoglobina no eritrócito. A CHGM depende da relação entre a quantidade de hemoglobina e o volume do eritrócito. Por norma a hemoglobina ocupa um terço do volume do GV[4].

1.5.4. Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (RDW)

Permite avaliar a variação no tamanho e diâmetro dos eritrócitos, representando uma medida da heterogeneidade da população eritrocitária. Obtém-se a partir do histograma[4].

Em condições normais, a maioria dos eritrócitos tem aproximadamente o mesmo tamanho, produzindo apenas um pico no histograma; a presença de doença pode modificar o tamanho de alguns deles. A diferença de tamanho entre os eritrócitos normais e menos normais produz mais de um pico no histograma ou um alargamento do pico normal[4].

1.6. Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos em circulação há menos de 48 horas. São reconhecidos graças à coloração que põe em evidência o retículo de que são providos, composto por restos de ribossomas. Fornecem uma estimativa da velocidade de produção de eritrócitos pela medula óssea, sendo portanto uma medida da eritropoiese efetiva[2].

Diagnóstico laboratorial de anemias

Considera-se a presença de anemia quando a concentração de hemoglobina ou o hematócrito se encontram abaixo do limite inferior dos valores de referência. A classificação da anemia é útil porque fornece uma referência conveniente para o diagnóstico diferencial. A anemia pode ser classificada de acordo com a patogenia, e neste caso três mecanismos podem ser responsáveis:

1. Anemia por deficiência de fatores, devido a deficiência de matérias-primas hematopoiéticas vitais. As mais comuns são a deficiência de ferro e a deficiência de ácido fólico, vitamina B_{12} ou ambas;
2. Anemia por defeito de produção, devido à incapacidade de libertação de eritrócito maduros no sangue periférico. Pode ser devida a : (1) substituição da medula óssea por

fibrose ou neoplasia; (2) hipoplasia da medula óssea, geralmente devido a substâncias químicas; ou (3) devido a doenças sistémicas;

3. Anemia por depleção, devido a perda de eritrócitos do sangue periférico. As causas mais comuns são: (1) hemorragia, aguda ou crónica; (2) anemia hemolítica; ou (3) hiperesplenismo[1,4].

Outra classificação das anemias baseia-se na morfologia dos eritrócitos. Podem assim ser classificadas em microcíticas, normocíticas ou macrocíticas, e podem ser subdivididas em hipocrómicas ou normocrómicas[1,4]. Na figura 2 encontra-se esquematizado o diagnóstico das anemias de acordo com esta classificação. São também referidos outros parâmetros laboratoriais que ajudam ao diagnóstico clínico.

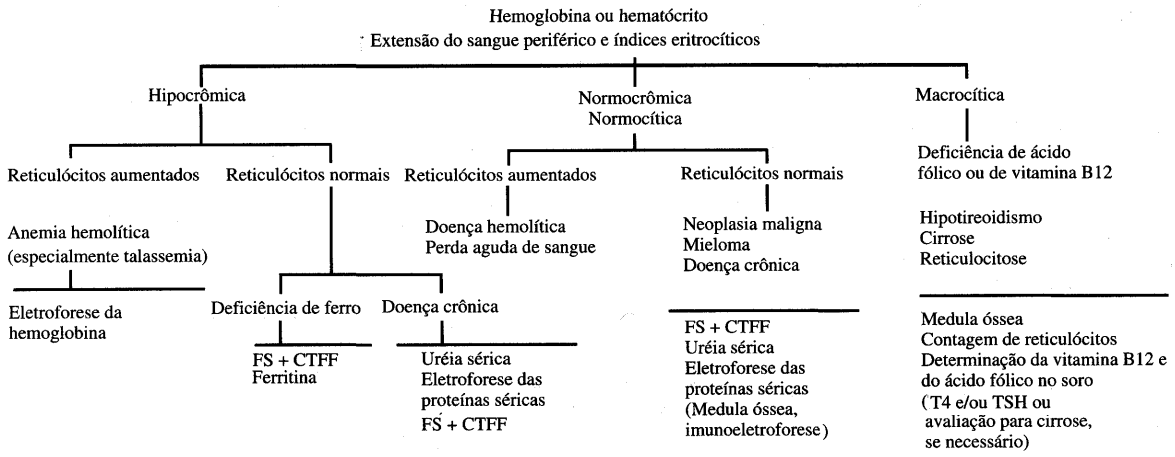


Figura 2 – Guia simplificado para o diagnóstico de anemias[4].
Legenda: FS – Ferro sérico; CTFF – Capacidade total de fixação do ferro.

1.7. Plaquetas

As plaquetas são células que derivam dos megacariócitos da medula óssea. Têm funções na hemóstase (Cap. 5) e na manutenção da integridade vascular[1].

A diminuição no número de plaquetas denomina-se por trombocitopenia, e constitui a anormalidade plaquetária mais comum. Esta condição pode ter diversas etiologias: (1) trombocitopenia imunológica: induzida por drogas; idiopática; ou pós-transfusional; (2) hiperesplenismo; (3) deficiência da medula óssea; ou (4) outras causas. Todavia, a trombocitose também pode ocorrer em certas circunstâncias. Na maioria dos casos não existe nenhum problema clínico até que a contagem ultrapasse 1 milhão/mm^3. Quando ultrapassa esse valor, verifica-se uma tendência aumentada ao sangramento e ao desenvolvimento de trombose. As doenças mais comuns associadas a trombocitose incluem a trombocitemia idiopática e as síndromes mieloproliferativas[4]. No laboratório Clinova

resultados de trombocitopenia ou trombocitose são confirmados em esfregaço de sangue periférico.

2. Estudo morfológico do sangue periférico

O exame microscópico das distensões sanguíneas constitui um dos exames laboratoriais de maior utilidade em hematologia. Permite visualizar o tamanho geral das células e identificar alterações no tamanho, forma e estrutura dos leucócitos e eritrócitos, que podem ter importância diagnóstica em certas doenças, assim como observar formas imaturas patológicas. Permite ainda avaliar a quantidade de hemoglobina nos eritrócitos, estimar a contagem de plaquetas e identificar a presença de agregados plaquetários[4].

No Clinova utiliza-se o método de May-Grünwald-Giemsa como processo de coloração. Consiste numa mistura de corantes de características neutras, dependentes do pH da solução corante, que em condições apropriadas coram os componentes nucleares e citoplasmáticos dos leucócitos, com predominância de tons vermelhos quando ácidos (acidófilos) e azulados diversos quando básicos (basofílicos)[5].

2.1. Eritrócitos

Figura 3 – Sangue periférico mostrando eritrócitos normais.

Os eritrócitos são células anucleadas, acidófilas e em forma de disco bicôncavo, cujo diâmetro varia entre 6-8 μm. Na distensão sanguínea apresentam uma área central mais pálida, que ocupa aproximadamente um terço da célula (Fig. 3). As células que apresentam morfologia normal são descritas como normocíticas e normocrómicas[5]. No laboratório Clinova apenas se comenta a morfologia eritrocitária anormal.

Anomalias dos eritrócitos detetadas na extensão sanguínea

Em situações patológicas os eritrócitos podem apresentar alterações no tamanho, forma, estrutura e coloração, ou apresentar inclusões eritrocitárias. Pode ainda ser observada a formação de *rouleaux* e a presença de eritroblastos[1]. Na tabela 3 escontram-se descritas as alterações dos eritrócitos mais frequentes, e as principais causas.

Tabela 3 – Interpretação de alterações nos eritrócitos[4,5].

Alteração	Caraterísticas	Principais Causas
Tamanho		
Microcitose	Diminuição do tamanho	Anemias por deficiência de ferro e talassemias
Macrocitose	Aumento do tamanho	Anemias megaloblásticas por defeito de vitamina B_{12} e/ou ácido fólico
Forma		
Esferócitos	Em forma de esfera	Esferocitose hereditária e anemias hemolíticas autoimunes
Eliptócitos	Eritrócitos alargados	Eliptocitose congénita
Dacriócitos	Em forma de lágrima	Anemia megaloblástica; talassemia minor; e mielofibrose
Equinócitos	Cobertos de pequenas espículas	Hepatopatias; síndrome hemolítica urémica; e défice de piruvatocinase
Acantócitos	Cobertos de espículas de diferentes comprimentos	Abetalipoproteinemia; hepatopatias; e após esplenectomia
Queratócitos	Eritrócitos com pares de espículas (geralmente duas)	Anemia hemolítica microangiopática e coagulação intravascular disseminada
Esquizócitos	Fragmentos de eritrócitos	Anemias hemolíticas microangiopática e mecânica
Em alvo	Coloração aumentada no meio da área de palidez central	Icterícia obstrutiva; talassemias; doença hepática; e hemoglobinopatias
Estomatócitos	Que apresentam uma fenda	Hepatopatia alcoólica
Inclusões eritrocitárias		
Pontilhado basófilo	Pequenas estruturas azul escuras por toda a área hemoglobinizada do eritrócito	Intoxicação por chumbo; β-talassemia minor; anemias megaloblásticas; e hemoglobinas instáveis
Corpos de Howell-Jolly	Uma pequena inclusão azul escura, de DNA, por eritrócito	Anemias hemolíticas graves e após esplenectomia
Corpúsculos de Pappenheimer	Pequenas inclusões granulares escuras de hemossiderina	Pós esplenectomia; anemia hemolítica grave; e anemias sideroblásticas
Rouleaux	Eritrócitos que aderem uns aos outros, dando o aspeto de pilhas de moedas espalhadas	Gravidez; condições inflamatórias; e discrasias de células plasmáticas, como o mieloma múltiplo
Eritroblastos	Precursores dos eritrócitos	Eritropoiese hiperplásica ou infiltração da medula óssea

2.2. Leucócitos

Numa distensão sanguínea apropriada os leucócitos devem estar distribuídos regularmente, sem concentrar-se excessivamente ao longo das margens ou na cauda. Os granulócitos são encontrados preferencialmente ao longo das margens e na cauda da distensão, enquanto os linfócitos se encontram ao centro[5].

2.2.1. Neutrófilos

O neutrófilo maduro (Fig. 4) mede entre 12 a 15 μm de diâmetro. O citoplasma é acidófilo, com muitos grânulos finos que coram de castanho a róseo. O núcleo possui cromatina em grumos, sendo dividido em dois a cinco lóbulos distintos por estreitos filamentos de heterocromatina densa, limitados pela membrana nuclear[5].

2.2.2. Eosinófilos

O eosinófilo (Fig. 4) mede entre 12 a 17 μm de diâmetro. O núcleo é usualmente bilobulado, mas pode ser trilobulado. Os grânulos dos eosinófilos são esféricos, preenchem o citoplasma e coram-se de laranja-avermelhado; o citoplasma é levemente basófilo[5].

2.2.3. Basófilos

O basófilo (Fig. 4) tem tamanho semelhante ao do neutrófilo (10 a 14 μm de diâmetro). O seu núcleo é segmentado e os grânulos são maiores e coram de púrpura escura[5].

2.2.4. Monócitos

O monócito (Fig. 4) é a maior célula do sangue periférico normal, com diâmetro entre 12 a 20 μm. Apresenta um núcleo irregular, parcialmente lobulado ou em forma de ferradura, e citoplasma cinza-azulado opaco que pode conter grânulos azurófilos finos[5].

2.2.5. Linfócitos

O linfócito (Fig. 4) tem um diâmetro que varia de 10 a 16 μm. Os linfócitos pequenos, que predominam, têm um núcleo redondo com cromatina condensada que ocupa a maior parte da célula. O citoplasma é escasso e não apresenta granulações. Os linfócitos grandes possuem citoplasma mais abundante e cromatina nuclear menos condensada. O citoplasma cora-se de azul pálido, podendo apresentar pequeno número de grânulos azurófilos[5].

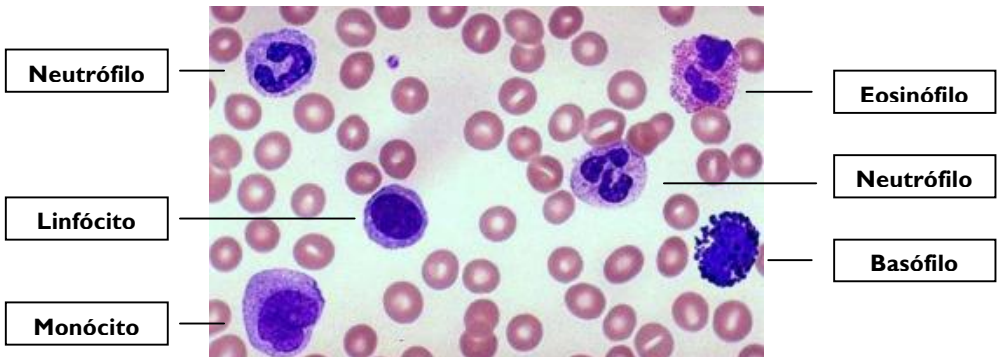


Figura 4 – Sangue periférico mostrando dois neutrófilos, um eosinófilo, um basófilo, um monócito e um linfócito. (acedido em http://www.conhecersaude.com)

Anomalias dos leucócitos detetadas na extensão sanguínea

As alterações leucocitárias, além de quantitativas, podem também ser qualitativas. Deste ponto de vista os leucócitos podem exibir maior grau de imaturidade, alterações morfológicas da sua estrutura celular ou produção aumentada de tipos de leucócitos menos comuns. Consoante a situação observada, diversas patologias podem estar associadas, nomeadamente: distúrbios benignos dos leucócitos; leucemias agudas; leucemias mieloides crónicas e síndromas mielodisplásicas; leucemias linfoides crónicas; linfomas; ou mieloma[2,5].

2.3. Plaquetas

As plaquetas são células anucleadas com a forma de disco delgado, com cerca de 1-3μm de diâmetro, que contêm finos grânulos azurófilos dispersos no citoplasma. No sangue anticoagulado pelo EDTA as plaquetas geralmente permanecem separadas umas das outras[5].

Anomalias das plaquetas detetadas na extensão sanguínea

As plaquetas podem apresentar alterações de tamanho possíveis de ser avaliadas ao microscópio. Plaquetas grandes são chamadas de macro trombócitos, e plaquetas muito grandes são denominadas plaquetas gigantes. Quando a renovação plaquetária está aumentada as plaquetas são usualmente grandes. Consequentemente, ausência de plaquetas grandes em pacientes com trombocitopenia sugere um defeito na produção plaquetária[5].

A agregação plaquetária pode ocorrer como resultado da estimulação durante a punção, ou mediada por imunoglobulina. O satelitismo plaquetário é outro fenómeno que pode ocorrer, sendo induzido por um fator plasmático, usualmente IgG ou IgM[5]. A observação destas situações no esfregaço sanguíneo permite-nos assim excluir falsas trombocitopenias.

3. Talassemias e hemoglobinopatias

A porção globínica da hemoglobina normal (HbA_1) é constituída por dois pares de cadeias α e dois pares de cadeias β ($\alpha 2\beta 2$). Todas as hemoglobinas normais possuem duas cadeias α, no entanto, certas hemoglobinas apresentam uma ou ambas as cadeias β com sequência de aminoácidos diferente das cadeias habituais. Assim, a HbA_2 possui duas cadeias δ ($\alpha 2\delta 2$), enquanto a HbF apresenta duas cadeias γ ($\alpha 2\gamma 2$). Estas três hemoglobinas (A_1, A_2 e F) estão normalmente presentes nos eritrócitos do adulto; todavia, as hemoglobinas A_2 e F só ocorrem normalmente em diminutas quantidades[4].

Existem dois grupos principais de distúrbios genéticos da hemoglobina: (1) talassemias, que resultam de um desequilíbrio na síntese de cadeias normais de globina e (2) hemoglobinopatias, como a drepanocitose e as hemoglobinas instáveis, que resultam de mutações de aminoácidos na cadeia de globina. A quantificação das frações normais da hemoglobina (A, A_2 e F) e a deteção de hemoglobinas anormais (S, C, E e D), permitem a identificação destas situações patológicas[1,4].

Equipamento e método

Figura 5 – ADAMS HA-8160[6].

O ADAMS HA-8160 (Fig. 5) realiza o doseamento das diferentes frações de hemoglobina através da sua separação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), utilizando uma coluna de resina de troca catiónica em fase reversa. A leitura das frações obtidas é realizada a 415nm e 500nm. No que respeita a hemoglobinas variante, apenas deteta a sua presença, não fazendo a distinção entre elas[6]. Estas determinações são efetuadas em sangue total em EDTA, e as amostras podem ser conservadas refrigeradas até 5 dias.

Diagnóstico laboratorial

Para cada amostra analisada é obtido um cromatograma com a identificação de 3 picos (F, s-A1c e A2) e a indicação da respetiva percentagem. Caso haja uma hemoglobina variante aparece um pico com a observação S/C Window. Nestes casos a amostra é enviada para um laboratório externo para realização da eletroforese de hemoglobinas. Em anexo III apresenta-se o cromatograma de uma amostra patológica obtido no ADAMA HA-8160.

Valores alterados de HbA, HbA_2 ou HbF permitem identificar talassemias. Estas patologias consistem num defeito na síntese das cadeias α ou β da HbA. Nas α-talassemias há uma produção diminuída de cadeias α e, como tal, ocorre uma diminuição da HbA ($\alpha 2\beta 2$), da

HbA_2 ($\alpha 2\delta 2$) e da HbF ($\alpha 2\gamma 2$). Nas β-talassemias há uma diminuição na síntese das cadeias β e, portanto um aumento da HbF ($\alpha 2\gamma 2$) ou HbA_2 ($\alpha 2\delta 2$) relativamente à HbA ($\alpha 2\beta 2$)[4].

3.1. Pesquisa de células falciformes

A hemoglobina falciforme ou hemoglobina S (HbS) é uma hemoglobina anormal que pode produzir vários estados patológicos. A HbS ocorre principalmente em indivíduos de raça negra e resulta de uma mutação na cadeia β da globina. Esta modificação favorece a polimerização da forma desoxigenada da hemoglobina que deforma os eritrócitos, tornando-os em forma de foice (drepanócitos), fragilizando-os e tornando-os rígidos, o que pode provocar anemia hemolítica e acidentes vaso-oclusivos[2].

O estado heterozigótico da HbS é denominado caráter falciforme, uma condição benigna, sem sintomas clínicos ou anormalidades hematológicas. Nestes casos a falciformação dos eritrócitos pode ser desencadeada por pressões extremamente baixas de oxigénio, podendo ocorrer enfartes esplénicos em viagens em altitudes elevadas, em aviões não pressurizados. O estado homozigótico da HbS produz anemia falciforme, uma anemia hemolítica crónica que se manifesta na infância e é geralmente fatal antes dos 30 anos de idade[1].

Diagnóstico laboratorial

No laboratório Clinova a presença de células falciformes é efetuada pelo teste da falciformação. Este teste tem por base a indução da formação de células falciformes quando o sangue é colocado em anaerobiose[4]. Quando se obtém um resultado positivo, a amostra é enviada para um laboratório externo para confirmação por eletroforese de hemoglobinas.

A anemia falciforme reconhece-se pela presença de 80-90% de HbS, e praticamente ausência de HbA, sendo o restante constituído por HbF[1,4].

4. Velocidade de sedimentação

A sedimentação das hemácias varia com um certo número de fatores, entre os quais a concentração plasmática das proteínas implicadas na inflamação e as imunoglobulinas séricas. A VS permite objetivar eventuais desequilíbrios entre estes diferentes fatores. Embora este teste seja muito pedido, nem sempre é fácil da interpretar, não sendo raros os casos em que uma VS elevada de modo isolado permanece inexplicável[2].

Equipamento e método

Figura 6 – Alifax Test 1[7].

O Alifax Test 1 (Fig. 6) determina a velocidade de sedimentação por fotometria capilar de fluxo. A determinação é feita em sangue total em EDTA. O sangue é centrifugado num capilar a 20G e a leitura é feita por fotometria de infravermelhos a um comprimento de onda de 950nm. Os impulsos elétricos captados por um detetor de fotodíodos estão diretamente relacionados com a concentração de eritrócitos no capilar. O número de impulsos medidos por metade do tempo é usado para delinear a curva de sedimentação para cada amostra, e os valores são então convertidos para valores comparados ao método de Westergreen[7].

Diagnóstico laboratorial

São considerados patológicos os casos em que a VS se encontra elevada, o que pode ocorrer devido a diversos fatores: fatores eritrocitários, como anemia, aglutinação eritrocitária e formação de cilindros; doenças inflamatórias, infeciosas e reumáticas; cancros e necroses tecidulares; e imunoglobulinas anormais: gamopatias monoclonais e elevações policlonais por hiperestimulação do sistema imunitário (hepatites crónicas, glomerulonefrites, etc.)[2].

5. Coagulação sanguínea

O sistema hemostático protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão, os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas. Depende de complexas interações entre a parede dos vasos, as plaquetas e os processos de coagulação e fibrinólise. É um dos mecanismos de defesa mais básicos do organismo pois preserva a integridade da circulação e limita a perda de sangue. A sequência de reações locais que culmina no controlo da hemorragia, a partir de um vaso lesado, define-se como hemóstase. É regulada por diferentes mecanismos e inclui várias fases:

1. **Resposta vascular** (constrição do vaso lesado);
2. **Hemóstase primária** (formação do trombo plaquetário);
3. **Hemóstase secundária ou coagulação** (formação do coágulo de fibrina)[8].

A coagulação sanguínea é um processo autocatalítico e autolimitado que culmina na formação de trombina em quantidades suficientes para a conversão do fibrinogénio em fibrina. Resulta da ativação sequencial dos fatores da coagulação e da formação de

complexos membranares. O coágulo sanguíneo é o promotor dos processos de reparação definitiva[8].

Modelo Clássico da Coagulação

Este modelo convencional referido como "cascata" foi proposto para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. Segundo este modelo, a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica sequencial de proenzimas por protéases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, quebra a molécula de fibrinogénio em monómeros de fibrina (Fig. 7).

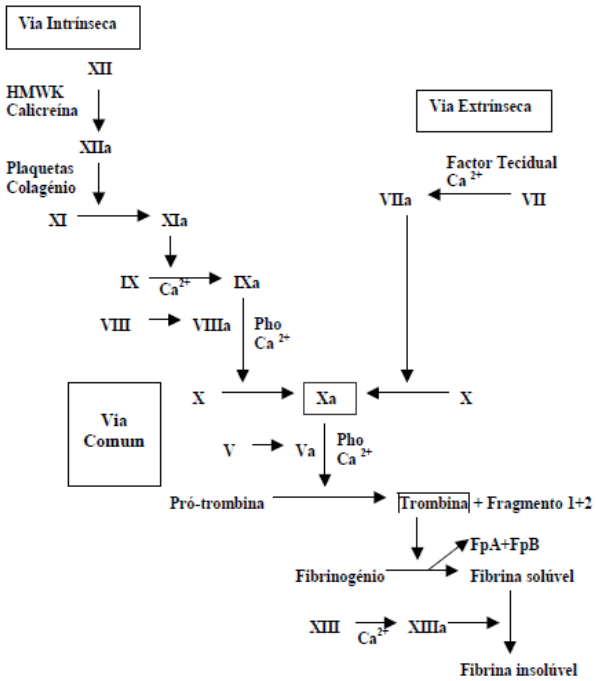


Figura 7 – Visão Clássica da Cascata da Coagulação[8]. Legenda: HMWK – cininogénio de alto peso molecular; Fp – fibrinopeptídeo; Pho – fosfolípidos; FT – fator tecidual.

Esta proposta divide a coagulação em uma via extrínseca (envolvendo elementos do sangue e também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular), que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X. Na via extrínseca, o fator VII plasmático é ativado na presença de seu cofator, o fator tecidual (FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT), responsável pela ativação do fator X. Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Este processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-calicreína (uma serinoprotease) e cininogénio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativado ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença

de fator VIII ativado por traços de trombina, e em presença e iões cálcio, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a formação de trombina e, subsequentemente, de fibrina[9].

O conceito clássico da cascata da coagulação tem entretanto falhado como um modelo do processo hemostático *in vivo*. A constatação de que os indivíduos deficientes em fator XII não têm hemorragias, de que a deficiência em fator XI conduz a uma heterogeneidade de sintomas hemorrágicos e de que deficiências nos fatores VIII (Hemofilia A) ou IX (Hemofilia B) produzem hemorragias graves, conduziu a uma reformulação da hipótese clássica do processo de coagulação. Surgiu assim o modelo celular da coagulação[8].

Modelo Celular da Coagulação

De forma diferente da visão tradicional, propõe-se um modelo em que os recetores celulares específicos passam a ter importância no processo de coagulação. Dessa forma, as células podem desempenhar diferentes papéis na hemostasia, dependendo do seu complemento de recetores de superfície. De acordo com este modelo a coagulação ocorre em três estágios que se sobrepõem (Fig. 8): (1) Início, que ocorre numa célula que expressa o fator tecidual; (2) Amplificação, no qual as plaquetas e os cofatores são ativados para preparar o terreno para a geração de trombina em larga escala; (3) Propagação, na qual grandes quantidades de trombina passam a ser geradas na superfície das plaquetas[10].

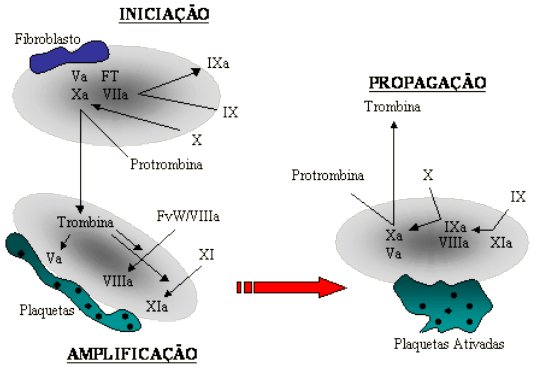


Figura 8 – Esquema da coagulação baseado no modelo celular[10].

Segundo este modelo, a iniciação da coagulação ocorre nas células que apresentam fator tecidual, o qual conduz à ativação do fator VII. Se um estímulo pró-coagulante é suficientemente forte, o complexo FVIIa/FT ativa os fatores IX e X que iniciam o processo de coagulação, levando à formação de trombina. A amplificação da resposta coagulante ocorre conforme a ação se move da célula para a superfície plaquetária; o estímulo pró-coagulante é amplificado conforme as plaquetas aderem, são ativadas e acumulam cofatores ativados em sua superfície. Finalmente na fase de propagação, proteases ativas combinam-se aos seus cofatores na superfície plaquetária, que é o lugar melhor adaptado para gerar

quantidades hemostáticas de trombina. A atividade dos complexos pró-coagulantes produz uma geração maciça de trombina que resulta na polimerização da fibrina[10].

Equipamento e método

Figura 9 – Sysmex CA-500[11].

Os doseamentos dos parâmetros analíticos que avaliam a coagulação sanguínea são efetuados em plasma citratado no Sysmex CA-500 (Fig. 9) por métodos coagulimétricos[11].

A determinação do tempo de protrombina é feita por medição do tempo de coagulação a 37°C de um plasma recalcificado na presença de fator tecidular e de fosfolípidos (tromboplastina), que ativa o fator X e inibe a intervenção dos fatores XII, XI e IX. A partir desta medição é efetuado o cálculo do fibrinogénio[11].

O tempo de tromboplastina parcial ativada é determinado por medição do tempo de coagulação a 37°C de um plasma citratado em presença de fosfolípidos, de cálcio e de um ativador dos fatores de contacto[11].

Estas determinações devem ser efetuadas num curto espaço de tempo após a colheita. Caso isso não seja possível as amostras devem ser congeladas.

5.1. Tempo de protrombina

O tempo de protrombina (TP) é utilizado em três situações: (1) monitorização da terapêutica com anticoagulantes; (2) triagem de distúrbios do sistema da coagulação; e (3) como prova de função hepática. Este teste explora principalmente a existência de defeitos no sistema extrínseco da coagulação (protrombina e fatores II, V, VII e X)[4].

Na medição do TP a tromboplastina desempenha um papel fundamental. De forma a uniformizar os resultados não havendo influência do reagente ou da técnica utilizada, foi criado o INR (*International Normalized Ratio*). O INR é a razão entre o TP do doente, em segundos, e o tempo padrão. Esta razão é elevada a um índice de sensibilidade internacional, que carateriza a tromboplastina utilizada relativamente a uma tromboplastina internacional padrão. O INR é a expressão internacional do TP, independentemente do laboratório[2].

Diagnóstico laboratorial

O prolongamento do TP pode dever-se a diversas causas, nomeadamente:

1. Tratamento anticoagulante por antivitamina K (AVK): o TP é sensível à diminuição de três dos fatores dependentes da vitamina K, os fatores II, VII e X;
2. Hipovitaminoses K: na ausência de tratamento pelos AVK a interpretação do prolongamento do TP necessita do doseamento dos fatores II, V, VII e X; neste caso

os fatores II, VII e X encontram-se diminuídos, enquanto o fator V e o fibrinogénio permanecem normais. Uma hipovitaminose K ocorre por icterícias obstrutivas e perturbações de absorção da vitamina K;

3. Insuficiência hepatocelular: ocorre um prolongamento do TP com diminuição dos fatores II, VII, X e V, frequentemente associado a uma descida do fibrinogénio;
4. Presença de heparina no plasma: prolonga o TP devido à sua ação antitrombótica[2].

5.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) é o teste mais utilizado para a exploração dos fatores plasmáticos da via intrínseca da coagulação. Com efeito, explora todos os fatores da via intrínseca e o tronco comum da coagulação, com exceção dos fatores plaquetários. É também utilizado para monitorizar os tratamentos anticoagulantes pela heparina[2].

Diagnóstico laboratorial

Um aumento do TTPA de mais de 10 segundos em relação ao padrão traduz, quer um défice num dos fatores da via intrínseca da coagulação quer a existência de um anticorpo circulante[2].

Os défices da via intrínseca podem traduzir: (1) hemofilia A: défice em fator VIII; (2) hemofilia B: défice em fator IX; (3) doença de Willebrand: uma afeção hemorrágica devido à diminuição ou falta do fator Willebrand, a proteína transportadora do fator VIII[2].

Os anticorpos circulantes são frequentemente antiprotrombinases, que se reconhecem durante as estimulações antigénicas prolongadas. Ocorrem no lúpus, na artrite reumatóide e na infeção pelo HIV[2].

5.3. Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma proteína sintetizada pelo fígado que se transforma em fibrina sob a influência da trombina, para a formação do coágulo[2].

Diagnóstico laboratorial

Uma hiperfibrinémia observa-se nas síndromas inflamatórias: reumatismo inflamatório; cancros; linfomas. Uma hipofibrinémia pode indicar: insuficiência hepatocelular; coagulação intravascular disseminada, devido a ativação patológica da hemostase; fibrinogenólise, devida à libertação de ativadores do plasminogénio na circulação e à presença no plasma de uma quantidade anormal de plasmina, que os inibidores fisiológicos não conseguem neutralizar[2].

6. Imunohematologia

A imunohematologia refere-se ao estudo serológico, genético, bioquímico e molecular de antigénios associados a estruturas membranares das células sanguíneas, e às propriedades e reações imunológicas de todos os constituintes do sangue. Envolve a realização de exames serológicos e a avaliação e interpretação das reações observadas, úteis para o estudo da patogénese, diagnóstico, prevenção e controlo da imunização associada a transfusões, gravidez e transplante de órgãos[1].

6.1. Grupo Sanguíneo

Os eritrócitos possuem vários antigénios de membrana, geneticamente determinados, que definem os grupos sanguíneos eritrocitários. Os sistemas antigénicos mais importantes para a clínica são os sistemas ABO e Rh[2].

6.1.1. Sistema ABO

O sistema ABO é definido pela presença à superfície dos eritrócitos de um antigénio A (grupo A), um antigénio B (grupo B), os dois antigénios (grupo AB) ou nenhum deles (grupo O), o que permite classificar todo o sangue humano em quatro grupos: A, B, AB e O[2].

A expressão fenotípica dos antigénios A e B depende de dois genes independentes, herdados um da mãe e outro do pai. Os genes para A e B são geralmente designados por I^A e I^B, e são dominantes; o gene O é designado por i, sendo recessivo (tabela 4)[2].

O soro de um dado indivíduo contém o anticorpo natural (anti-A ou anti-B) que corresponde ao antigénio ausente dos seus eritrócitos. Quando as hemácias transportam os dois antigénios, o soro não contém qualquer anticorpo; contém os dois anticorpos se as hemácias não possuírem nenhum dos dois antigénios[2].

Tabela 4 – Grupos sanguíneos e respetivas características[2].

Grupo sanguíneo	Genótipo	Antigénio	Anticorpos
A	I^Ai ; I^AI^A	A	Anti-B
B	I^Bi ; I^BI^B	B	Anti-A
AB	I^AI^B	A e B	Nenhum
O	ii	Nenhum	Anti-A e Anti-B

Diagnóstico laboratorial

No laboratório Clinova a determinação do grupo sanguíneo é feita por hemaglutinação, com sangue total em EDTA. Baseia-se na aglutinação direta dos eritrócitos com um reagente

contendo anticorpos conhecidos (anti-A e anti-B), o que é indicativo da presença do antigénio correspondente. A ausência de aglutinação indica a inexistência do antigénio[1].

6.1.2. Sistema Rh

O sistema Rhesus é um sistema complexo, constituído por vários antigénios produzidos por três unidades genéticas (DdEeCc), situadas no mesmo cromossoma e que se transmitem em bloco. Para as necessidades da clínica basta geralmente distinguir entre os indivíduos Rh positivo (Rh+) e Rh negativo (Rh-). Os indivíduos Rh+ possuem um gene D, seja no estado homozigótico (DD), seja no estado heterozigótico (Dd), que exprimem sobre as suas hemácias; os indivíduos Rh- (dd) não possuem o antigénio D[2].

Não existem anticorpos naturais no sistema Rhesus, o que significa que os indivíduos Rh- não têm anticorpos séricos anti-D. No entanto, os anticorpos podem aparecer após contacto com o antigénio D, por ocasião de uma transfusão, ou em caso de gravidez de uma criança Rh+ de mãe Rh-. Uma segunda transfusão com sangue Rh+ pode desencadear uma reação de hemólise e uma nova gravidez pode provocar uma doença hemolítica do recém-nascido[2].

Diagnóstico laboratorial

No laboratório Clinova a determinação do fator Rh é feita por hemaglutinação, com sangue total em EDTA. Baseia-se na aglutinação direta dos eritrócitos com um reagente contendo anticorpos anti-D, indicativo da presença do antigénio D, logo Rh positivo[1]. Se no prazo de 2 minutos não ocorrer aglutinação é considerado Rh negativo.

Alguns indivíduos possuem um subgrupo fraco de D denominado D fraco. O sangue com D fraco pode não produzir uma reação positiva com alguns soros comerciais anti-D, podendo resultar numa falsa tipagem de Rh-. Nestes casos é necessária confirmação pelo teste de Coombs indireto[4]. Este teste é assim efetuado sempre que se obtém um resultado Rh-.

6.2. Teste de Coombs

O teste de Coombs procura pôr em evidência anticorpos fixados à superfície dos eritrócitos. Existem muitos anticorpos IgG que não são capazes de produzir hemaglutinação direta detetável, sendo necessário utilizar reagentes de antiglobulina humana. O reagente utilizado no Clinova é poliespecífico, contendo anticorpos do tipo IgG para imunoglobulina humana e para o grupo C3d do complemento. Estes anticorpos atuam como ponte entre eritrócitos já sensibilizados com anticorpos ou complemento, produzindo uma rede característica da segunda fase da hemaglutinação[1].

6.2.1. Teste de Coombs direto

O teste de Coombs direto demonstra a presença de anticorpos *in vivo* que recobrem os eritrócitos. Trata-se de um método em uma etapa, em que o soro de Coombs é adicionado a uma preparação de eritrócitos após a sua lavagem (a fim de remover as proteínas séricas inespecíficas). Se os eritrócitos estiverem cobertos de anticorpos ocorrerá a sua aglutinação [4].

Um resultado positivo pode indicar: doença hemolítica do recém-nascido, anemia hemolítica em adultos, ou reações transfusionais hemolíticas[4].

6.2.2. Teste de Coombs indireto

O teste de Coombs indireto destina-se a pôr em evidência anticorpos antieritrocitários no soro do doente, permitindo precisar a especificidade do anticorpo. Este teste é feito em duas etapas. Na primeira etapa o soro do doente é incubado com eritrócitos de fenótipo conhecido (cujos antigénios de membrana são conhecidos); os anticorpos fixam-se sobre os eritrócitos que possuem o antigénio correspondente. Na segunda etapa realiza-se o teste de Coombs direto[2].

Um resultado positivo pode servir para detetar: imunização materno-fetal de mãe Rh- contra os eritrócitos fetais Rh+, antigénios fracos, ou autoanticorpos do tipo crioaglutinina[4].

V. Imunologia

A secção de imunologia do laboratório Clinova encontra-se em parte automatizada, envolvendo também a realização de técnicas manuais. Durante o estágio em imunologia obtive formação nos equipamentos utilizados, ficando responsável pela sua preparação e operação. Efetuei a verificação de reagentes, calibrações, controlos diários e manutenções, para além do trabalho diário. Fiquei também responsável pela realização das técnicas manuais. Os conhecimentos teóricos adquiridos durante o mestrado em análises clínicas, e o seu aprofundamento durante o estágio, permitiram-me efetuar a validação de resultados.

Esta secção engloba diversas áreas de estudo, nomeadamente: marcadores de anemia, marcadores tumorais, serologia infeciosa, alergologia e função endócrina. Neste capítulo são referidas as análises efetuadas na secção de imunologia do laboratório Clinova, a sua importância clínica e forma de diagnóstico laboratorial, assim como o respetivo equipamento e método utilizados. Em anexo IV e V apresentam-se os valores de referência dessas análises.

1. Imunoensaios

Os imunoensaios são técnicas para a deteção e quantificação de antigénios ou anticorpos, que têm por base a interação antigénio-anticorpo. Podem ser empregues com uma variedade de sistemas de deteção, que vão de leituras visuais a fotométricas, com substratos cromogéneos, quimioluminescentes ou fluorescentes[12]. No laboratório Clinova utilizam-se técnicas manuais de aglutinação de partículas, e métodos imunoenzimáticos automatizados, por quimioluminescência e ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent ImmunoAssay*).

1.3. Ensaios de aglutinação de partículas

A reação de aglutinação carateriza-se pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e antigénios. O processo de aglutinação ocorre em duas fases. Na primeira o anticorpo liga-se ao antigénio correspondente, mantendo-se unidos por ligações não covalentes. Na segunda fase, múltiplas partículas com anticorpos a si ligados formam uma rede estável através de ligações antigénio-anticorpo entre células adjacentes. Esta rede é a base das reações de aglutinação visíveis a olho nú[1,12].

A aglutinação diz-se direta se ocorrer com partículas que apresentam antigénios naturais à sua superfície (p. ex. hemácias). No caso de partículas inertes (p. ex. partículas de látex), às quais se adsorvem antigénios solúveis, denomina-se por aglutinação indireta[12].

1.4. Imunoensaios enzimáticos

Os imunoensaios enzimáticos são métodos quantitativos que utilizam uma fase sólida para imobilização de um dos reagentes, e antigénios ou anticorpos marcados com enzimas. A adição de substrato específico para a enzima permite a quantificação[12].

Estes ensaios são os utilizados pelos equipamentos Immulite 2000, ADVIA Centaur e VIDAS. Os dois primeiros efetuam imunoensaios enzimáticos de quimioluminescência. Utilizam substratos quimioluminescentes, que reagem com marcadores enzimáticos gerando luz. O autoanalisador VIDAS utiliza a técnica ELFA, que combina um imunoensaio enzimático com uma leitura final em fluorescência[12]. Na tabela 5 descriminam-se as análises efetuadas na secção de Imunologia do Clinova, por equipamento e método.

Os imunoensaios podem ser efetuados por diferentes métodos: sanduíche, captura de IgM ou competição. Nos dois primeiros a quantidade detetada é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo ou antigénio na amostra, enquanto no método competitivo a relação é inversamente proporcional[12].

Método de sanduíche

Pode ser utilizado para a deteção de antigénios ou anticorpos. A fase sólida é fixada com anticorpos/antigénios específicos que vão ligar aos antigénios/anticorpos da amostra. De seguida incuba-se com excesso de anticorpo/antigénio marcado com enzima[12].

Método de captura de IgM

A fase sólida é sensibilizada com anti-IgM específicos, havendo a captura de qualquer IgM da amostra. De seguida é incubada com antigénio, seguida de anticorpo específico marcado[12].

Método de competição

Este método é mais utilizado para a deteção de antigénios, podendo utilizar-se antigénios marcados ou anticorpos marcados. No primeiro caso, a fase sólida é fixada com anticorpos específicos e incubada com o conjugado antigénio-enzima, na presença da amostra. No segundo caso, antigénios específicos são fixados à fase sólida que é incubada com o conjugado anticorpo-enzima, na presença da amostra. Em ambos os casos a reação antigénio-anticorpo é competitivamente inibida pelos antigénios da amostra. Após a obtenção do equilíbrio da reação, incuba-se com o substrato da enzima para quantificação[12].

Tabela 5 – Parâmetros doseados na secção de Imunologia e respetivos equipamentos e métodos.

Autoanalisador	Método	Parâmetros
Immulite 2000	Quimioluminescência	
	Competitivo	T_3 total; T_3 livre; T_4 total; T_4 livre
	Sanduíche	TSH; TG; ATA; ATG; PSA total e livre; IgE totais; Anti-CMV IgG e IgM; Anti-RUB IgG e IgM; Anti-TOXO IgG; AgHBs; Anti-HBs; Anti-HBc
	Captura de IgM	Anti-TOXO IgM
ADVIA Centaur	Quimioluminescência	
	Competitivo	Ácido fólico; Vitamina B_{12}; Estradiol; Progesterona; Testosterona; Anti-HAV total
	Sanduíche	Ferritina; FSH; LH; Prolactina; β-hCG; PTH; AFP; CA 125; CEA; CA 19-9; Anti-HCV; Anti-HIV;
	Captura de IgM	Anti-HAV IgM
VIDAS	ELFA	
	Sanduíche	CA 15-3; Anti-HBe; AgHBe; Anti-TOXO* IgG; Anti-CMV* IgG e IgM; Anti-RUB* IgG
	Captura de IgM	Anti-HBc IgM; Anti-TOXO* IgM; Anti-RUB* IgM

* Estes testes apenas são realizados no VIDAS para confirmação de resultados

Autoanalisador Immulite 2000

Fig. 10 – Immulite 2000[13].

O Immulite 2000 (Fig. 10) utiliza esferas de poliestireno como fase sólida. A amostra é incubada com fosfatase alcalina e a camada ligada à fase sólida é quantificada usando um substrato de dioxetano para produzir luz. A luz é emitida quando o substrato quimioluminescente reage com a fosfatase alcalina ligada à esfera[13].

Autoanalisador ADVIA Centaur

Fig. 11 – ADVIA Centaur[14].

O ADVIA Centaur (Fig. 11) mede a quantidade de luz emitida durante a reação quimioluminescente, desencadeada pela alteração de pH devida à adição de um ácido e uma base na fase final da reação. Utiliza éster de acridínio como marcador e partículas paramagnéticas como fase sólida[14].

Autoanalisador VIDAS

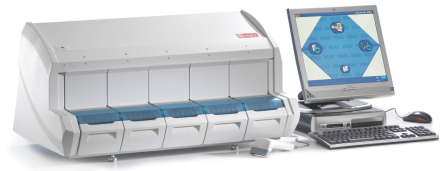


Fig.12 – VIDAS[15].

O VIDAS (Fig. 12) utiliza como fase sólida cones fixados com anticorpos ou antigénios. A fosfatase alcalina é a enzima que vai catalisar a reação de hidrólise do substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) num produto fluorescente (4-metil-umbeliferona)[15].

2. Marcadores de anemia

Como já foi referido no capítulo III, um dos mecanismos responsáveis por anemias é a deficiência de fatores (matérias primas hematopoiéticas vitais). As causas mais comuns incluem a deficiência de ferro, e de vitamina B_{12}, ácido fólico ou ambos[1].

2.1. Ácido Fólico

O ácido fólico é indispensável à síntese do ADN, necessária à maturação normal dos eritrócitos. É fornecido pela alimentação (carnes e legumes), absorvido ao longo de todo o intestino delgado e armazenado no fígado. É libertado no sangue consoante as necessidades[2].

2.2. Vitamina B_{12}

A vitamina B_{12} (cianocobalamina) é necessária para a síntese adequada de ADN, devido ao seu papel no metabolismo do ácido fólico. A maior parte da vitamina B_{12} provém dos alimentos de origem animal, principalmente carne, ovos e laticínios. É absorvida no íleo com a ajuda do fator intrínseco (FI) produzido pelas células parietais do fundo gástrico[4].

Diagnóstico laboratorial

As carências de ácido fólico ou vitamina B_{12} resultam no desenvolvimento de anemia megaloblástica, normocrómica e macrocítica, neutropenia com granulócitos de grande tamanho e hipersegmentados e trombocitopenia. A contagem de reticulócitos é normal[2].

A deficiência de ácido fólico pode ocorrer devido a causa dietética (comum no alcoolismo crónico) ou mal absorção (doença primária do intestino delgado). A deficiência de vitamina B_{12} pode dever-se a ingestão inadequada (vegetarianos estritos), produção deficiente de FI pela mucosa gástrica (anemia perniciosa) ou síndromas de mal absorção (doença celíaca, ressecção do intestino delgado ou doença inflamatória do mesmo)[4].

2.3. Ferritina

A ferritina é a proteína de armazenamento do ferro. A ferritina é encontrada essencialmente nas células do fígado, baço, medula óssea e células reticuloendoteliais, permanecendo nos tecidos corporais até ser necessária para a eritropoiese. O seu doseamento permite avaliar a quantidade de ferro armazenada no organismo[1,2].

Diagnóstico laboratorial

A diminuição dos níveis de ferritina é um sinal precoce de carência de ferro, ocorrendo antes do aparecimento de alterações no ferro sérico, na morfologia dos eritrócitos ou do desenvolvimento de anemia. A concentração de ferritina no soro, quando analisada juntamente com outros fatores como o ferro sérico e a capacidade total de fixação do ferro, é útil no diagnóstico de anemias por deficiência de ferro, anemias por infeções crónicas e talassémias[4].

3. Estudo da função endócrina

O sistema endócrino é um sistema altamente integrado onde hipotálamo, hipófise e glândulas endócrinas comunicam através de um sistema de *feedback* de inibição e estimulação. Atua no controlo do metabolismo, crescimento, fertilidade e resposta ao stress[1].

3.1. Hormonas da função tiroideia

A tiroide é uma glândula endócrina que se encontra dividida em lóbulos, cada um composto por 20 a 40 folículos. Os folículos contêm colóide, cujo principal componente é a tiroglobulina, o local de armazenamento das hormonas tiroideias. As hormonas tiroideias atuam perifericamente na mediação de numerosos processos metabólicos[1].

3.1.1. TSH

A tirotrofina (TSH) é uma hormona glicoproteica sintetizada e secretada pela hipófise anterior, cuja função é o controlo da biossíntese e libertação das hormonas da tiroide. A secreção da TSH é regulada pelo hipotálamo através da hormona libertadora da tirotrofina (TRH), bem como pelo *feedback* negativo das hormonas tiroideias[1]. A secreção da TSH é muito sensível às variações das hormonas tiroideias circulantes. Fracas elevações de T_3 (triiodotironina) ou T_4 (tiroxina) inibem-na, enquanto a diminuição estimula a sua secreção[2].

3.1.2. Hormonas tiroideias

Para a produção das hormonas tiroideias o iodeto é captado do sangue pelas células da tiroide; a iodinação de resíduos de tirosina na tiroglobulina resulta na formação da monoiodotirosina (MIT) e da diiodotirosina (DIT). A tetraiodotironina ou tiroxina (T_4) é formada por dois resíduos de DIT; a triiodotironina (T_3) é formada por um resíduo de MIT e um de DIT.

A tiroide liberta sobretudo T_4, sendo no entanto a T_3 muito mais ativa. Cerca de 80% da produção diária de T_3 ocorre através da conversão de T_4 em T_3, sobretudo no fígado. As hormonas tiroideias são secretadas na circulação em resposta ao TSH e reguladas por um mecanismo de feedback negativo[1].

3.1.2.1. T_3

A T_3 é uma hormona que tem origem na secreção direta pela tiroide e na conversão periférica de T_4 em T_3. Na circulação encontra-se na sua maioria ligada a uma proteína de transporte, a TBG (*thyroxin binding globulin*). Apenas uma pequena percentagem circula na forma livre (FT_3), a única metabolicamente ativa[1].

3.1.2.2. T_4

A T_4 representa a maioria da produção hormonal da tiroide e circula no plasma ligada a proteínas de transporte: cerca de 70% ligada à TBG, 20% à transtiretina e 10% à albumina. Uma pequena percentagem circula na forma livre (FT_4), a única metabolicamente ativa[2].

3.1.2.3. FT_3 e FT_4

A FT_3 e a FT_4 são as formas livres e fisiologicamente ativas das hormonas T_3 e T_4, respetivamente. Podem ser importantes na avaliação da função tiroideia, uma vez que numerosos fatores podem modificar a ligação da T_3 e T_4 às suas proteínas transportadoras (aumento congénito da TBG, toma de estrogénios, gravidez e síndrome nefrótica), tornando difícil a interpretação dos seus doseamentos[2].

Diagnóstico laboratorial

A elevação da TSH é o sinal mais sensível de hipotiroidismo primário. A TSH encontra-se aumentada enquanto a FT_4 está diminuída. Esta diminuição pode ser isolada, mantendo-se a FT_3 normal. No adulto, o hipotiroidismo primário pode resultar de uma involução espontânea da tiroide, de uma tiroidite crónica autoimune (Hashimoto), de um tratamento pelo iodo radioativo ou de uma sobrecarga iodada. O hipotiroidismo secundário traduz-se

por diminuição da FT_4 e da TSH. A normalização da FT_4 e da TSH asseguram que a dose terapêutica é suficiente[2].

No hipertiroidismo a FT_4 encontra-se elevada qualquer que seja a sua causa (doença de Basedow, adenoma tóxico ou bócio multinodular tóxico). Manifesta-se por uma taxa permanentemente baixa da TSH, acompanhada de uma elevação de FT_3 e FT_4. Os valores normalizam por influência do tratamento[2].

3.1.3. Anticorpos antitiroideus

Os distúrbios autoimunes da tiroide ocorrem quando auto anticorpos ligam às membranas celulares da tiroide, causando danos celulares e reações inflamatórias que alteram a função da tiroide. Os principais responsáveis por estas desordens autoimunes são: os anticorpos antiperoxidase (ATPO), dirigidos contra os microssomas citoplasmáticos das células da tiroide, e os anticorpos antitiroglobulina (ATG), dirigidos contra a tiroglobulina [1,2]. Estão associados ao hipotiroidismo na tiroidite crónica autoimune (Hashimoto e atrófica), observando-se no geral os ATPO mais frequentemente[1,4].

A obtenção de títulos elevados de ATPO (ou ATPO e ATG) não é específica da tiroidite crónica, visto que pacientes com doença de Graves ou hipotiroidismo primário podem apresentar títulos elevados ou baixos. Todavia, a observação de títulos normais ou apenas ligeiramente elevados constitui certa evidência contra o diagnóstico de tiroidite crónica[4].

3.2. Paratormona

A paratormona (PTH) é produzida pela glândula paratiroide e tem como função fisiológica primária regular a concentração do cálcio extracelular[1]. Ao nível dos ossos, aumenta a absorção óssea estimulando os osteoclastos e inibindo a atividade dos osteoblastos; ao nível dos rins, estimula a reabsorção do cálcio e aumenta a fosfatúria. A sua secreção é regulada pela calcemia[2].

Diagnóstico laboratorial

O doseamento da PTH permite distinguir o verdadeiro hipoparatiroidismo (doença autoimune) do pseudo-hipoparatiroidismo (resistência periférica à PTH). No primeiro caso ocorre hipocalcémia profunda com hipocalciúria, e a PTH encontra-se muito baixa. No pseudo-hipoparatiroidismo a PTH encontra-se elevada[2].

No hiperparatiroidismo primário a PTH encontra-se moderadamente aumentada, pois a sua secreção é parcialmente inibida pela hipercalcemia. O doseamento da PTH permite ainda

distinguir uma hipercalcemia paratiroideana (PTH elevada) de uma hipercalcemia com outra origem (PTH baixa)[2].

3.3. Hormonas da função gonadal

Os distúrbios mais comuns nos quais se recorre a provas da função gonadal incluem o hipogonadismo no homem e distúrbios menstruais, problemas de fertilidade e hirsutismo ou virilização na mulher. As determinações hormonais mais frequentes incluem a hormona luteinizante (LH), a hormona folículoestimulante (FSH), a progesterona, a testosterona, o estradiol e a gonadotrofina coriónica humana (hCG)[4].

A função gonadal é regulada pela secreção hipotalâmica da hormona de libertação das gonadotrofinas (GnRH), a qual induz a secreção das gonadotrofinas (LH e FSH) pelas células da hipófise. O controlo da secreção de GnRH e das gonadotrofinas é efetuado por um mecanismo de *feedback* dos órgãos alvo para a hipófise e o hipotálamo[4].

3.3.1. FSH e LH

A FSH e a LH são hormonas polipeptídicas secretadas pelas células da hipófise anterior. São transportadas no sangue até aos seus locais de ação, os testículos ou os ovários, onde atuam em conjunto para provocar a sua estimulação. Na mulher a FSH assegura a maturação folicular, e estimulando as células da granulosa provoca a secreção dos estrogénios. A LH desencadeia a ovulação no seu pico secretório (Fig. 13) e mantém a secreção do estradiol e da progesterona pelo corpo amarelo durante a fase luteínica. No homem, a FSH estimula a espermatogénese nas células de Sertoli dos túbulos seminíferos. A LH atua sobre as células de Leydig dos testículos que sintetizam a testosterona[1,2].

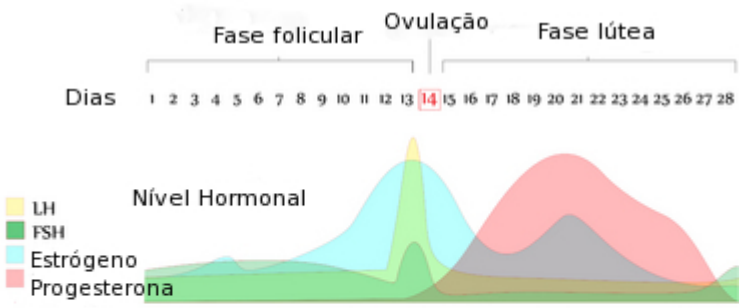


Figura 13 – Ciclo menstrual. (acedido em http://ciclo-menstrual.info)

Diagnóstico laboratorial

As alterações na produção das gonadotrofinas têm como causas mais frequentes neoplasias, infeções ou distúrbios da região hipotálamo-hipofisária[16]. Estas causas encontram-se sumarizadas na tabela 6.

O doseamento da FSH durante o ciclo menstrual permite diferenciar a insuficiência ovárica de alterações hipofisárias, útil para o diagnóstico de amenorreias. A LH é útil nos tratamentos de fertilidade, uma vez que permite determinar o momento da ovulação[2].

Tabela 6 – Causas de anomalias na produção de gonadotrofinas[17].

FSH e LH aumentadas	Hipofunção ovárica primária (Síndrome de Turner, Menopausa); Hipergonadismo secundário (Puberdade precoce); Insuficiência testicular primária; Síndrome de Kleinfelter; Síndrome de Turner; Castração masculina; Patologia testicular
FSH e LH diminuídas	Hipofunção da hipófise anterior; Hipogonadismo secundário em mulheres (tumores, hipertiroidismo, diabetes descontrolada, anorexia, …); Hipogonadismo secundário em homens (Síndrome de Kallman); Cancro de próstata;
FSH normal e LH aumentada	Doença poliquística dos ovários

3.3.2. Estrogénios

Os estrogénios são compostos que derivam de precursores androgénicos (DHEA e androstenediona) sintetizados no córtex supra-renal, nos ovários e nos testículos. Têm como função principal o desenvolvimento e manutenção da morfologia e fisiologia femininas[4,16].

Existem 3 estrogénios principais: o estradiol (17-β-estradiol), a estrona e o estriol. O estradiol é o estrogénio ovárico predominante, a estrona o de maior concentração na mulher pós-menopausa e o estriol o principal estrogénio da placenta[1,4]. No Clinova apenas se efetua o doseamento do estradiol.

3.3.2.1. 17-β-Estradiol

O estradiol é o principal estrogénio segregado durante o ciclo ovárico pelos folículos de Graaf. É o estrogénio da mulher em período de atividade fértil[2].

Durante o ciclo menstrual (Fig. 13) os níveis de estradiol sobem significativamente ao sétimo dia da fase folicular, suprimindo os níveis de FSH e despoletando uma subida rápida da LH. Os níveis de estradiol descem significativamente quando a LH atinge o ponto mais alto. Durante a fase luteínica os níveis tornam a aumentar, estando implicados na regressão do corpo lúteo. A menos que o óvulo seja fertilizado os níveis de estradiol diminuem, assinalando o início de um novo ciclo. Durante a pré-menopausa os níveis diminuem constantemente até aproximadamente 15% dos níveis da menopausa[1].

Diagnóstico laboratorial

O doseamento do estradiol é utilizado no estudo da função ovárica, na monitorização do desenvolvimento folicular em programas de fertilização, na reprodução medicamente assistida e na confirmação da menopausa[1].

Os níveis de estradiol encontram-se aumentados na gravidez e em casos de tumores produtores de estrogénios; encontram-se diminuídos na menopausa e em casos de insuficiência ovárica, ovário poliquístico, amenorreias de origem hipotalâmica, hirsutismo ou hipogonadismo por hipopituitarismo[1,17].

3.3.3. Progesterona

A progesterona, em conjunto com os estrogénios, regula as funções do sistema reprodutivo durante o ciclo menstrual. A progesterona é crítica na preparação do endométrio para a implantação do blastocisto e na manutenção da gravidez. As principais fontes de progesterona nas mulheres são o corpo lúteo e a placenta. Fontes menos significativas, em homens e mulheres, são o córtex adrenal e os testículos[1].

Os níveis de progesterona são baixos durante a fase folicular do ciclo menstrual (Fig. 13). Após a ovulação, a produção de progesterona pelo corpo lúteo aumenta rapidamente. A sua secreção é estimulada, essencialmente, pela LH. Estes níveis caem depois para os níveis de referência, induzindo a menstruação. Durante a gravidez a produção de progesterona passa do corpo lúteo para a placenta, havendo um aumento regular da sua concentração até ao final do terceiro trimestre[1,2].

Diagnóstico laboratorial

Na mulher menstruada, o doseamento da progesterona é um bom elemento para confirmar a ovulação e avaliar a qualidade da fase luteínica. Uma produção inadequada de progesterona pode indicar deficiência da fase luteínica, associada a infertilidade e abortos de repetição. As causas mais frequentes são: secreção insuficiente de FSH, insuficiência ovárica,

hiperandrogenia e hiperprolactinemia. O doseamento da progesterona durante a gravidez reflete a atividade placentária[2,16,17].

3.3.4. Testosterona

A testosterona é o principal androgénio nos homens, sendo secretada pelas células de Leydig dos testículos por estimulação da LH. É responsável pela diferenciação dos órgãos genitais externos masculinos e pelas características sexuais secundárias, sendo também necessária à espermatogénese. Nas mulheres a maioria da testosterona no sangue é derivada do metabolismo da androstenediona, sendo apenas pequenas quantidades secretadas diretamente pelos ovários e glândulas adrenais. A testosterona exerce efeitos de *feedback* negativo sobre as gonadotrofinas ao nível hipotalâmico e hipofisário[1,2,4].

Cerca de 60 a 75% da testosterona circulante no soro encontra-se ligada à globulina de ligação das hormonas sexuais (SHBG, *Sex Hormone Binding Globulin*), e 20 a 40% ligada à albumina sérica, enquanto 1 a 2% ocorre na forma livre. Esta fração é a única biologicamente ativa. As determinações séricas da testosterona medem a testosterona total[4].

Diagnóstico laboratorial

As principais causas de baixos níveis de testosterona nos homens incluem hipogonadismo hipogonadotrófico e insuficiência testicular. Nas mulheres, níveis elevados de testosterona podem ser indicativos de síndrome do ovário poliquístico, tumor ovárico ou supra-renal. As manifestações clínicas incluem infertilidade, hirsutismo, amenorreia e obesidade[1,4].

3.4. Prolactina

A prolactina é uma hormona peptídica hipofisária, cuja principal função é estimular e manter a lactação nas mulheres. Os níveis de prolactina aumentam assim durante a gravidez[4].

O principal mecanismo regulador da secreção de prolactina consiste num efeito inibidor exercido pelo hipotálamo sob o controlo da dopamina. Os antagonistas da dopamina bloqueiam a via de inibição hipotalâmica, resultando em secreção aumentada de prolactina. A TRH, o VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e a serotonina são fatores de estimulação[2,4].

Nos adultos a secreção de prolactina segue um ritmo circadiano. Ocorrem picos secretórios a intervalos regulares durante o dia, e os níveis aumentam durante a noite. É também influenciada pelo exercício físico, o stress, a hipoglicémia e alguns fármacos[4].

Diagnóstico laboratorial

A hipersecreção de prolactina pode estar associada a hipotiroidismo primário, lesões hipotalâmicas, insuficiência renal e prolactinomas hipofisários. Acima de 100 ng/mL existe

grande probabilidade de se tratar de um prolactinoma, sendo este diagnóstico certo quando ultrapassa os 250 ng/mL[1,2].

A hiperprolactinemia está associada a hipogonadismo em ambos os sexos. Nas mulheres pode provocar amenorreia, galactorreia e infertilidade. Nos homens, a inibição da síntese de testosterona pode levar a diminuição da espermatogénese, impotência e infertilidade. Outras manifestações incluem hiperinsulinemia, intolerância à glicose e distúrbios psiquiátricos[1].

3.5. Gonadotrofina coriónica humana (hCG)

A hCG é uma glicoproteína segregada pelo sinciciotrofoblasto, estando implicada na manutenção do corpo lúteo durante o primeiro trimestre da gravidez. Esta hormona surge 48 horas após a implantação do ovo. É composta por duas subunidades: uma cadeia α comum às LH, FSH e TSH, e uma cadeia β específica que lhe confere as suas propriedades bioquímicas e imunológicas. É esta última que se doseia[1].

Os níveis séricos de hCG são detetáveis entre 8 a 10 dias após a conceção, duplicando a aproximadamente cada dois dias durante as primeiras seis semanas de gestação. Entre a 8ª e a 10ª semana os níveis atingem um pico, diminuindo de modo bastante rápido durante a última parte do primeiro trimestre. Os níveis ficam então estabilizados durante o resto da gravidez[4].

Diagnóstico laboratorial

O doseamento da β-hCG no sangue e/ou na urina permite realizar o diagnóstico precoce da gravidez. Níveis inferiores a 5 mUI/ml encontram-se em mulheres não grávidas, enquanto valores superiores a 25 mUI/ml são interpretados como positivos. Os valores entre 5 a 25 mUI/ml são inconclusivos e devem ser confirmados com uma segunda colheita, 2 a 3 dias depois. Isto porque, em caso de gravidez, os valores duplicam a cada dois dias[2,4].

Para além da utilização no diagnóstico precoce da gravidez, o doseamento da β-hCG é também útil na deteção de gravidez ectópica ou aborto espontâneo, na despistagem da trissomia 21 (juntamente com a α-fetoproteína e o estriol) e na deteção de neoplasias produtoras de hCG. Pode ser usada como marcador tumoral na monitorização de pacientes com tumores ovarianos de células germinativas, sendo também útil para o diagnóstico e monitorização do tratamento dos tumores testiculares[1,4].

4. Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são substâncias cuja presença no organismo tem relação com uma situação neoplásica maligna. Uma vez que não são específicos dos tecidos (exceto o PSA), e

podem ser expressos noutras doenças não neoplásicas, não têm sensibilidade e especificidade suficientes para serem utilizados no rastreio do cancro. São utilizados predominantemente na monitorização de pacientes oncológicos[1].

Os marcadores tumorais mais utilizados para diagnóstico clínico podem ser divididos em: (1) antigénios oncofetais, como a AFP e o CEA; (2) antigénios tumorais, como o CA 19-9, o CA 125 e o CA 15-3; (3) enzimas, como o PSA; e (4) hormonas, como a tiroglobulina[1].

4.1. α-Fetoproteína

A α-fetoproteína (AFP) é uma proteína sérica fetal importante e também uma das principais proteínas carcinoembrionárias. É o principal marcador para auxiliar no diagnóstico e monitorização do carcinoma hepatocelular. Níveis elevados de AFP podem também ser encontrados em pacientes com tumores de células germinativas do ovário e testículos, teratocarcinomas dos testículos, cancro gastrointestinal, pancreático e pulmonar. Encontra-se ainda transitoriamente elevada na gravidez e em hepatopatias benignas[1,2].

4.2. CEA

O antigénio carcinoembrionário (CEA) é um antigénio associado ao cancro colorretal. A sua elevação encontra-se bem relacionada com o grau de diferenciação do cancro e a sua extensão. Fornece por isso informações importantes quanto ao prognóstico do paciente, a recorrência após remoção cirúrgica e a eficácia da terapêutica[2]. Níveis elevados de CEA podem no entanto também ocorrer em casos de cancro do esófago, estômago, pulmão, pâncreas e da mama, na doença de Crohn, e em cirroses, hepatites e pancreatites crónicas[2].

4.3. CA 19-9

O CA 19-9 é um antigénio circulante associado principalmente ao cancro do pâncreas. É igualmente um marcador dos cancros colorretais, mas com uma menor sensibilidade. O seu doseamento é principalmente útil na monitorização da evolução após ressecção do tumor e na deteção de recidivas. Níveis elevados podem também ser encontrados em pacientes com cancro hepatocelular e em caso de pancreatite crónica e colestase[2].

4.4. CA 125

O CA 125 é um antigénio circulante associado ao cancro do ovário. O seu doseamento é maioritariamente útil na deteção de recidivas de carcinoma do ovário após cirurgia. Nestes casos, a alteração nos valores ou a obtenção de títulos crescentes é bastante significativa[4]. Apesar de o CA 125 ser o melhor marcador do cancro do ovário, observam-se também

valores elevados nos cancros do cólon ou da mama com metástases, nas afeções ginecológicas benignas (endometrioses) e derrames peritoneais mesmo não neoplásicos[2].

4.5. CA 15-3

O CA 15-3 é um antigénio circulante associado ao cancro da mama, embora também se encontre presente noutros adenocarcinomas, incluindo os do cólon, pulmão, ovário e pâncreas. É no entanto um marcador mais específico e mais sensível para a monitorização do decurso clínico em pacientes com cancro da mama metastático, e para deteção de recidivas em pacientes previamente tratados[1].

4.6. PSA total

O antigénio específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína segregada pelas células glandulares da próstata, que não se encontra em qualquer outro tecido. A sua sensibilidade e especificidade tecidular fazem do PSA o marcador mais útil para rastreio e monitorização do cancro da próstata. O seu doseamento é particularmente útil na monitorização do sucesso da prostatectomia radical, uma vez que a remoção completa da próstata resulta em níveis de PSA praticamente indetetáveis. Qualquer aumento desses níveis é assim um indicador de recidiva ou de presença de metástases[1,2].

A principal desvantagem do PSA é o facto de não distinguir entre cancro da próstata e lesões benignas. Condições como hiperplasia benigna da próstata, prostatite aguda ou enfarte podem também estar relacionadas com valores elevados de PSA no soro. Por outro lado, o valor de *cutoff* estipulado (4.0 ng/mL) não é suficiente para distinguir entre pacientes com ou sem cancro da próstata, uma vez que cerca de 25% dos pacientes com cancro apresentam valores dentro da faixa de referência[1,4].

4.7. PSA livre

O PSA existe no soro nas formas complexada e livre. O cancro da próstata está geralmente associado a um aumento do PSA complexado e uma diminuição do PSA livre, enquanto na hiperplasia benigna da próstata a fração livre é significativamente mais elevada. O rácio PSA livre/PSA total permite assim fazer essa distinção[1].

O doseamento do PSA livre permitiu aumentar a especificidade da deteção do carcinoma prostático em doentes com PSA total entre 4 a 10 ng/mL, reduzindo as biópsias desnecessárias. Pode ainda ser utilizado como preditor de carcinoma da próstata em pacientes com valores de PSA total abaixo do valor de referência[1].

4.8. Tiroglobulina

A tiroglobulina é o principal constituinte do colóide da tiroide, sendo o suporte da síntese, do armazenamento e da libertação das hormonas tiroideias. A tiroglobulina passa pouco para a circulação, salvo quando a arquitetura da tiroide é desorganizada por lesões inflamatórias ou tumorais. A maioria das doenças da tiroide são por isso suscetíveis de elevar a tiroglobulina. Pode, no entanto, ser utilizada para monitorização do carcinoma diferenciado da tiroide, visto que a persistência de valores elevados, ou a sua subida após tratamento, é sinal de recidiva[2].

5. Serologia de infeções víricas

Os vírus são a causa mais frequente de doenças infeciosas em humanos, podendo ir desde simples constipações a comprometimento imunológico fatal e infeções oportunistas. O diagnóstico laboratorial das infeções víricas baseia-se em testes serológicos, que detetam antigénios do vírus ou anticorpos (imunoglobulinas) contra eles produzidos pelo organismo[1]. Em anexo V apresentam-se os respetivos valores de referência.

A imunoglobulina M (IgM) é a primeira a ser produzida, no início da resposta primária. É por isso um marcador de infeção aguda. A imunoglobulina G (IgG) é o anticorpo predominante na resposta secundária, persistindo por longos períodos. As aplicações principais destes doseamentos são o diagnóstico de infeções recentes e a determinação de imunidade[1,12,16].

5.1. Hepatite A

A hepatite A é causada pela infeção com o vírus da hepatite A (HAV). O período médio de incubação da infeção é de 3 a 4 semanas e a transmissão é feita por via fecal-oral. Ocorre principalmente devido à ingestão de água ou alimentos contaminados[12].

A infeção aguda em crianças ocorre geralmente de forma assintomática, mas os adultos podem ocasionalmente desenvolver infeção grave. Os sintomas típicos são febre, anorexia, náuseas, vómitos e icterícia. A infeção não evolui para a cronicidade nem para o estado de portador assintomático, e a hepatite fulminante ou morte são raras[1,12].

Diagnóstico laboratorial

As IgM anti-HAV são as primeiras a aparecer no soro, permanecendo positivas por um período médio de 4 meses. A sua presença indica por isso infeção aguda. As IgG anti-HAV

aparecem logo após as IgM, e os títulos aumentam gradualmente durante a evolução da doença, persistindo durante toda a vida. São um indicador de infeção passada e imunização[1].

5.2. Hepatite B

A hepatite B é causada pela infeção com o vírus da hepatite B (HBV). A partícula viral (partícula de Dane) é constituída por uma camada externa lipoproteica que contém o antigénio de superfície (AgHBs), e por um núcleo central (*core*) que possui outros dois antigénios importantes, o AgHBc e o AgHBe[4].

O HBV é transmitido por contacto com o sangue e fluidos de indivíduos infetados, por via percutânea, mucocutânea, sexual ou perinatal. Possui um período de incubação de 45 a 180 dias e pode provocar desde infeções assintomáticas ou com sintomas de gravidade variável, a hepatite fulminante com elevada taxa de mortalidade. Em cerca de 10% dos casos a doença passa à cronicidade. A hepatite B crónica pode ser assintomática ou provocar lesões hepáticas de gravidade variável, que pode evoluir para cirrose ou mesmo carcinoma hepatocelular. As características clínicas de doença variam consideravelmente, sendo os sintomas típicos anorexia, náuseas, vómitos, sintomas gripais e fadiga[1,4,12].

Diagnóstico laboratorial

O serodiagnóstico da infeção por HBV é efetuado através dos doseamentos dos antigénios HBs e HBe, e dos anticorpos anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe. Após a infeção pelo HBV, o **AgHBs** é o primeiro marcador serológico a ser detetado no sangue (Fig. 14), apresentando elevados títulos na fase aguda da doença. Nos casos de evolução para a cura desaparece num período inferior a 6 meses, persistindo quando há evolução para a cronicidade[2,12].

O **AgHBe** também é detetado na fase aguda, logo após o AgHBs, estando associado a uma replicação viral ativa. Nos casos de evolução para a cura desaparece em poucas semanas, com uma seroconversão para anti-HBe. Se se mantiver por mais tempo indica cronicidade. Na infeção crónica a presença do AgHBe geralmente corresponde a um prognóstico de maior gravidade, com maior dano hepático, e de elevado índice de infecciosidade[4,12].

A seroconversão do AgHBe em **anti-HBe** indica o fim da replicação viral. Um resultado anti-HBe positivo é um indicador de evolução para a cura, sobretudo se não forem detetados AgHBs nem AgHBe. Em portadores, o anti-HBe pode indicar baixo nível de contágio ou inatividade da hepatite crónica[2,17].

O **anti-HBc IgM** aparece na fase aguda da doença, 3 a 5 semanas após o AgHBs, e persiste entre 6 a 18 meses. Gradualmente vai aparecendo o **anti-HBc IgG**. O anti-HBc IgG persiste geralmente por toda a vida, qualquer que seja a evolução, para a cura ou para a

cronicidade. Apresenta-se por isso positivo em todos os pacientes com infeção passada ou recente. O anti-HBc é por vezes o único marcador que se deteta nas primeiras semanas da infeção, no chamado "período de janela", entre o desaparecimento do AgHBs e o aparecimento do anti-HBs. Na hepatite crónica a positividade do anti-HBc IgM evidencia uma infeção ativa[2,12,17].

O **anti-HBs** aparece algumas semanas após o desaparecimento do AgHBs, e persiste durante anos. É um indicador de convalescença, recuperação e imunização. Em vacinados contra o HBV é utilizado como marcador de resposta antigénica. Uma taxa de 10 UI/mL é considerada protetora[2,17].

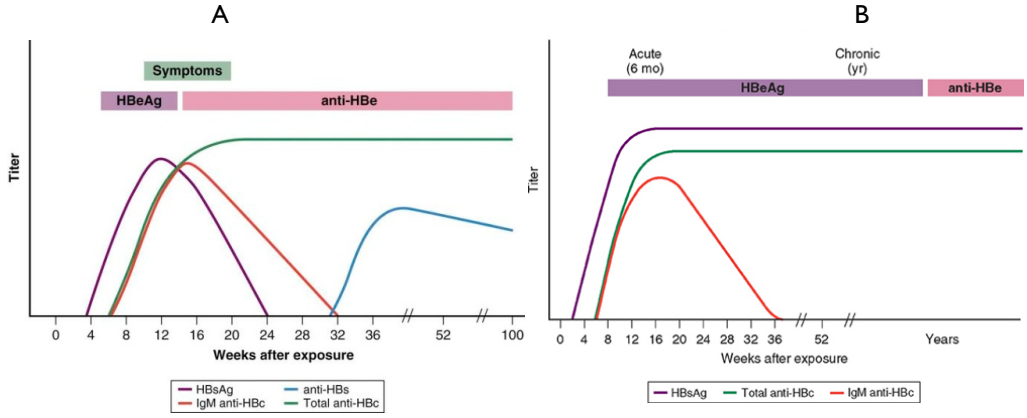


Figura 14 – A – Curso serológico da hepatite B aguda para a cura.
B – Curso serológico da hepatite B para a cronicidade.
(acedido em http://www.clevelandclinicmeded.com)

5.3. Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é o agente etiológico da hepatite C. As formas comuns de transmissão do HCV incluem o consumo de drogas injetáveis e as transfusões sanguíneas; a transmissão por via sexual ou durante a gravidez ocorre excecionalmente[1].

A infeção por HCV é muitas vezes assintomática, no entanto, a maioria dos indivíduos (mais de 80%) torna-se cronicamente infetados. Em 20% destes a doença progride para cirrose, insuficiência hepática e possível carcinoma hepatocelular. A coinfecção com HBV ou HIV acelera o processo, e com HAV pode provocar hepatite fulminante[1,4].

Diagnóstico laboratorial

A infeção por HCV é diagnosticada pela deteção de anticorpos contra o vírus. Resultados muito elevados em relação ao valor de *cutoff* têm elevada probabilidade de indicar infeção crónica, enquanto resultados pouco acima do *cutoff* são muitas vezes falsos positivos,

necessitando por isso de confirmação[1]. De qualquer forma, no Clinova, todos os resultados positivos para anti-HCV são confirmados com segunda colheita e em laboratório externo.

5.4. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2)

O HIV é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Enquanto o HIV-1 apresenta uma distribuição mundial, o HIV-2 é encontrado predominantemente na África Ocidental. As principais formas de transmissão são por contacto sexual, exposição a sangue ou produtos do sangue infetados e via perinatal[1,4].

O HIV infeta e destrói os linfócitos T CD4+, importantes na imunidade celular. O período de incubação é de 2 a 6 semanas, e em cerca de 50% dos pacientes é seguido de uma doença de tipo viral aguda. Os sintomas incluem febre, dor de garganta e linfadenopatia, erupção cutânea, mialgias, diarreia e vómito. Após a doença aguda inicial existe um amplo espectro de efeitos possíveis: os pacientes podem tornar-se portadores assintomáticos; apresentar respostas imunológicas deficientes na ausência de doença clínica; desenvolver linfadenopatia generalizada persistente; adquirir uma variedade de infeções fúngicas, bacterianas ou virais; ou desenvolver SIDA[1,4].

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infeção pelo HIV é efetuado pela deteção de anticorpos contra o vírus. Pelo facto de detetar os anticorpos e não os antigénios virais não permite reconhecer a infeção fase inicial, isto é, antes da formação de anticorpos. Este período de janela imunológica dura em média 3 semanas, não excedendo normalmente as 6 semanas[2].

No laboratório Clinova todos os resultados positivos para HIV são confirmados com uma segunda colheita e enviados para um laboratório externo para confirmação.

5.5. Vírus de Epstein-Barr

O vírus de Epstein-Barr (EBV) é o agente etiológico da mononucleose infeciosa (MI), uma doença sistémica linfoproliferativa. O vírus é transmitido principalmente pela troca de saliva, e a infeção em crianças é geralmente assintomática. Em adolescentes ou jovens adultos origina frequentemente mononucleose infeciosa. O EBV infeta em primeiro lugar o epitélio da faringe, atinge a corrente sanguínea e infeta os linfócitos B. Os linfócitos T citotóxicos reagem contra as células B infetadas, infiltrando-se no baço, no fígado e circulando no sangue periférico como linfócitos atípicos[1,4].

As manifestações clínicas da doença incluem febre, faringite e adenopatia, com aumento dos nódulos linfáticos, hepato e esplenomegalia. Uma vez instalada a infeção o vírus pode permanecer latente, e ser posteriormente reativado produzindo doença clínica[1,4].

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico MI pode ser efetuado através de provas serológicas. No laboratório Clinova utiliza-se o **teste de Paul-Bunnell**, um teste de aglutinação em lâmina baseado em anticorpos heterófilos. Os anticorpos heterófilos de Paul-Bunnell são anticorpos de tipo IgM de origem incerta que não são específicos da infeção por EBV, mas que raramente são encontrados noutros distúrbios. Aparecem na primeira semana de doença clínica, diminuem durante a convalescença e tornam-se normalmente indetetáveis entre 3 a 6 meses[1,4].

O teste de Paul-Bunnell baseia-se no facto de os anticorpos heterófilos associados à MI aglutinarem hemácias de carneiro, cavalo e boi. Inicialmente é efetuado um teste de rastreio que permite a aglutinação das hemácias pelos anticorpos heterófilos associados à MI, mas também por anticorpos heterófilos não específicos. Em caso de positividade é por isso efetuado um teste de absorção diferencial, que permite distinguir os anticorpos associados à MI dos não específicos. Esta distinção é feita pela absorção desses anticorpos não específicos a antigénios em células de rim de cobaias; a aglutinação das hemácias só ocorre se estiverem presentes os anticorpos associados à MI[1,4].

5.6. Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é o agente causador da doença de inclusão citomegálica. A infeção é adquirida através do contacto com secreções corporais ou urina, e a maioria das pessoas com infeção aguda permanece total ou quase totalmente assintomática. Os indivíduos sintomáticos apresentam sintomas semelhantes aos da mononucleose infeciosa, e pacientes imunocomprometidos podem desenvolver uma doença mais grave[4].

A infeção por CMV é a infeção intrauterina mais comum. Entre 1 a 2% das mulheres grávidas desenvolvem infeção primária por CMV, e em 30 a 50% destes casos ocorre infeção fetal. Aproximadamente 10% dos bebés infetados são sintomáticos, podendo apresentar icterícia, hepato-esplenomegalia, microcefalia e pancitopenias. Destes, aproximadamente 10% morrem e os restantes apresentam sequelas neurológicas permanentes. Nos casos de reativação de uma infeção por CMV o vírus também pode atravessar a placenta, mas as IgG anti-CMV da mãe também, fornecendo alguma proteção. Estas crianças são geralmente assintomáticas, mas 5 a 15% apresentam surdez ou atraso no desenvolvimento mental[1,4].

Diagnóstico laboratorial

Existe uma elevação das IgM anti-CMV no início da fase aguda da doença, pelo que o seu doseamento é útil no diagnóstico de uma infeção primária. Estas podem no entanto persistir por mais de 3 meses após a infeção, obscurecendo o valor interpretativo de um resultado

positivo durante a gravidez. Nestes casos o teste da avidez das IgG anti-CMV torna-se útil para diferenciar infeções recentes de infeções remotas. Nos bebés assintomáticos o isolamento do CMV da urina ou saliva, ou a deteção das IgM anti-CMV, são os únicos marcadores de infeção congénita[1].

As IgG anti-CMV aparecem cerca de uma semana após as IgM, persistindo durante toda a vida. Este resultado isolado não permite diferenciar entre infeção recente, recorrente ou latente, pelo que deve ser avaliado em conjunto com o doseamento das IgM[4].

5.7. Vírus da Rubéola

A rubéola (sarampo alemão) é uma doença altamente contagiosa que se manifesta por febre ligeira e exantema transitório, e pode ocorrer tanto em adultos como em crianças. A principal importância clínica da rubéola reside na ocorrência de infeção materna durante a gravidez, principalmente durante o primeiro trimestre, uma vez que pode conduzir à síndrome da rubéola congénita no feto. Esta síndrome inclui uma ou mais das seguintes condições: cardiopatia congénita, cataratas, surdez e lesão cerebral[1,4]. O serodiagnóstico da rubéola é assim efetuado como rastreio pré-gestacional, para saber se existe imunidade, ou em caso de suspeita de uma infeção por rubéola em evolução na mulher grávida[2].

Diagnóstico laboratorial

A presença de IgM anti-rubéola está relacionada com uma primo-infeção recente, visto que estas desaparecem em 6 semanas. A primo-infeção é a única perigosa para o feto[2].

As IgG anti-rubéola podem indicar infeção em curso, infeção antiga ou imunização por vacinação. Devem por isso ser interpretadas em conjunto com as IgM. Nos casos de reinfeção, sem perigo, observa-se uma subida somente das IgG[2].

6. Serologia de infeções parasitárias

6.1. Toxoplasmose

O agente etiológico da toxoplasmose é o *Toxoplasma gondii*, um parasita protozoário intracelular obrigatório que tem o gato como hospedeiro definitivo. A infeção pode ser adquirida através da ingestão de carnes mal cozinhadas contendo cistos, ou através da ingestão de oocistos por material contaminado com fezes de gato. Uma vez ingeridos, os microrganismos encistam em vários tecidos, sobretudo no músculo, e permanecem em estado de latência durante muitos anos ou durante toda a vida do hospedeiro[1,4].

Em indivíduos imunocompetentes a infeção é geralmente assintomática, podendo ocorrer manifestações de tipo viral com linfadenopatia, febre baixa e mal-estar. Em indivíduos imunodeprimidos, principalmente com SIDA, a infeção apresenta-se com envolvimento do sistema nervoso central, resultando geralmente da reativação de uma infeção latente[1,4].

A forma congénita da toxoplasmose ocorre quando a mãe adquire a infeção durante a gravidez. Quando é adquirida durante o primeiro trimestre da gravidez as manifestações clínicas são geralmente mais graves, podendo provocar microcefalia, hidrocefalia, ou mesmo morte intrauterina. Infeções que ocorram numa fase mais adiantada da gravidez são geralmente assintomáticas ao nascimento, mas meses ou anos mais tarde podem-se manifestar por coriorretinite, atraso psicomotor ou desordens convulsivas. O diagnóstico serológico da toxoplasmose é por isso efetuado como rastreio pré-gestacional, como forma de identificar as mulheres seronegativas que constituem uma população de risco. Estas mulheres devem ser vigiadas durante toda a gravidez[1,2].

Diagnóstico laboratorial

As IgM anti-toxoplasmose aparecem 1 a 2 semanas após a infeção, e em geral tornam-se indetetáveis entre 6 a 12 meses. Este doseamento é assim útil no diagnóstico de infeções agudas e congénitas. As IgG anti-toxoplasmose começam a aumentar cerca de 4 a 7 dias após as IgM. Começam a diminuir lentamente em cerca de 6 meses, e em geral verifica-se a persistência de baixos títulos durante muitos anos[1,4].

Na mulher grávida, a toxoplasmose é confirmada pela presença das IgM. Nestes casos o teste da avidez das IgG torna-se útil para diferenciar infeções recentes de infeções remotas, uma vez que as IgM podem persistir pelo menos até 12 meses[1].

7. Serologia de infeções bacterianas

As provas serológicas permitem identificar os agentes etiológicos associados a determinadas infeções bacterianas, através da deteção de anticorpos no sangue do paciente dirigidos contra bactérias específicas[4]. No Clinova estes testes serológicos são efetuados pelo método de aglutinação de partículas (Cap. 1.1).

7.1. Febre tifóide e febre paratifóide

O agente etiológico da febre tifóide é a *Salmonella typhi*. A infeção é transmitida por via fecal-oral, através de água e alimentos contaminados, e os sintomas consistem em febre crescente que atinge o pico à segunda semana, distúrbios gastrointestinais e esplenomegalia[4].

A febre paratifóide é causada por salmonelas diferentes da *S. typhi*. É provocada pelos serótipos A, B e C e apresenta um quadro clínico semelhante ao da febre tifóide, embora mais leve. O diagnóstico é feito de forma semelhante[4].

Diagnóstico laboratorial

Os melhores métodos para o diagnóstico da febre tifóide incluem as hemoculturas na primeira e segunda semanas da doença, e as culturas de fezes na terceira e quarta semanas. Além das culturas, podem ser efetuadas provas serológicas. Estas contribuem para o diagnóstico de febre tifóide quando as hemoculturas e as coproculturas são negativas[2,4].

Existem três antigénios principais de *Salmonella typhi:* os antigénios H (flagelar), O (somático) e Vi (capsular). Os títulos de anticorpos contra os antigénios H e O constituem a **reação de Widal**, o teste utilizado no laboratório Clinova. Consiste em colocar diluições de soro do doente em presença dos antigénios e observar se ocorre aglutinação[2,4].

Na febre tifóide aparecem no soro tanto aglutininas O como H, mas as primeiras surgem em título muito mais elevado. Aparecem entre 7 a 10 dias após o início da doença, e os títulos máximos são alcançados entre a terceira e a quarta semanas. Nos indivíduos não vacinados, ou nos vacinados há mais de um ano, os títulos de 1:40 para o antigénio H e 1:80 para o antigénio O são suspeitos, enquanto os títulos de 1:80 para o antigénio H e 1:160 para o antigénio O são definitivamente significativos. Todavia, a vacinação recente pode provocar um aumento pronunciado nos títulos de antigénio O, H ou ambos. O antigénio O é mais significativo que o H para o diagnóstico. Resultados falsos negativos podem ocorrer devido a antibioterapia ou a amostras obtidas antes de o paciente ter alcançado o título máximo, logo resultados negativos ou baixos títulos não excluem o diagnóstico da doença[4].

7.2. Rickettsioses

As rickettsioses são infeções provocadas por rickéttsias. Estes microrganismos assemelham-se, até certo ponto, a pequenas bactérias. Possuem uma parede celular Gram-negativa e são inibidas por determinados antibióticos. São microrganismos intracelulares obrigatórios que apenas são transmitidos por artrópodes vetores que se alimentaram do sangue de um paciente portador da doença, e não por contacto pessoal[1,4].

As infeções por riquétsias geralmente analisadas são: tifo endémico, tifo murino, tifo rural, febre maculosa das montanhas rochosas, febre Q e doença da arranhadura do gato[1,4].

Diagnóstico laboratorial

Uma vez que não existem meios artificiais de cultura para estes microrganismos, é preciso efetuar a inoculação do material em embriões ou animais vivos. Assim, poucos laboratórios

efetuam a cultura de riquétsias. Por conseguinte, as provas serológicas substituem a cultura como meio diagnóstico. O método utilizado no laboratório Clinova é a **reação de Weil-Félix**. Este teste de aglutinação em látex utiliza o facto de certas infeções provocadas por riquétsias produzirem anticorpos que também reagem (ou sofrem reação cruzada) com antigénios contidos nas estirpes de *Proteus* OX-19, OX-K e OX-2. Os anticorpos aparecem entre 7 a 10 dias após o início da doença. A obtenção de títulos de 1:80 é suspeita, enquanto de 1:160 é definitivamente significativo. Na tabela 7 apresentam-se as infeções por riquétsias possíveis de ser diagnosticadas pela reação de Weil-Félix[1,4].

A reação de Weil-Félix possui no entanto sérias limitações. Em primeiro lugar obtém-se um elevado número de falsos positivos limítrofes. Uma vez que a reação depende do antigénio de Proteus, é preciso afastar a possibilidade de infeção das vias urinárias por este microrganismo quando a prova é positiva. Em segundo lugar, cerca de dois terços dos pacientes com febre maculosa das montanhas rochosas apresentam reações falso negativas. Nesta doença é por isso preferível a utilização de outro método[1,4].

Tabela 7 – Infeções por riquétsias detetáveis pela reação de Weil-Félix[1,4].

Doença	Estirpe de Proteus	Vetor	Agente etiológico
Tifo epidémico	OX-19; OX-2	Piolho	*Rickettsia prowazekii*
Tifo murino	OX-19; OX-2	Pulga do rato	*Rickettsia mooseri*
Tifo rural	OX-K	Ácaro	*Orientia tsutsugamushi*
Febre maculosa das montanhas rochosas	OX-19; OX-2	Carrapato	*Rickettsia akari*

7.3. Brucelose

A brucelose é uma infeção causada por *Brucella* spp., pequenos cocobacilos Gram-negativos, imóveis e aeróbios estritos. São parasitas intracelulares que infetam uma grande variedade de espécies animais, incluindo o homem. As espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* são patogénios humanos. Os hospedeiros preferenciais são a cabra e a ovelha para *B. melitensis*, o gado para *B. abortus*, o porco para *B. suis*, e o cão para *B. canis*[1].

A brucelose pode ocorrer por inalação do microrganismo; por contacto direto com material animal infetado; ou pela ingestão de leite ou produtos lácteos não pasteurizados, originados de animais infetados. O fator de risco mais comum é o consumo de queijo de cabra feito a partir de leite não pasteurizado. Os sinais e sintomas são geralmente variáveis e inespecíficos, ocorrendo frequentemente febre, calafrios, mialgia e anorexia. A febre é carateristicamente diurna e ondulante. Pode ainda ocorrer linfadenopatia e formação de granulomas no fígado, baço, osso, pulmão, trato geniturinário e tecidos moles[1].

Diagnóstico laboratorial

A realização de culturas de *Brucella* spp. é difícil e demorada. Os meios sólidos devem ser incubados numa atmosfera contendo 5 a 10% de CO_2, e os microrganismos apresentam crescimento lento. Mesmo após 48 horas de incubação as colónias podem ser difíceis de visualizar. O serodiagnóstico adquire assim grande importância[1,2]. No laboratório Clinova este é efetuado através da **reação de Hudlesson**.

A reação de Hudlesson é uma prova de aglutinação em lâmina. Consiste na pesquisa de aglutinação de uma suspensão de *B. abortus* mortas por diluições crescentes do soro em estudo. O método põe em evidência anticorpos do tipo IgM, dando resultados positivos 10 a 15 dias após o início dos sinais clínicos; surge negativo após o 6º mês. É considerado positivo numa taxa de pelo menos 1:80, mas pode apresentar falsos positivos devido a reatividade cruzada com *Francisella tula*rensis ou *Vibrio cholerae*, incluindo a vacina anti-colérica[1,2].

7.4. Sífilis

O agente etiológico da sífilis é a espiroqueta *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. A transmissão ocorre principalmente por contacto sexual, através do contacto direto com lesões ativas, podendo também ocorrer transmissão vertical através da placenta[1].

O curso da infeção pode ser dividido em várias fases. A fase primária (sífilis primária) ocorre num período médio de 3 semanas, e manifesta-se pelo desenvolvimento de cancro duro (úlceras superficiais nos órgãos genitais externos). Esta lesão primária não ocorre no entanto em todos os pacientes. O cancro cicatriza entre 2 a 8 semanas dando início à fase secundária (sífilis secundária). Esta dura entre 2 a 12 semanas e é caracterizada pela disseminação pela corrente sanguínea e o envolvimento dos órgãos, com presença de sintomas constitucionais. A maioria dos pacientes apresenta erupção cutânea que afeta principalmente a palma das mãos e a planta dos pés. Após a resolução da fase secundária a infeção entra num período de latência durante a qual o paciente não apresenta sinais de infeção. Nos primeiros 4 anos podem ocorrer recidivas, principalmente no primeiro ano. Os pacientes não tratados podem desenvolver sífilis terciária, numa fase tardia que pode ir de 10 a 25 anos após a fase primária. As manifestações mais sérias envolvem o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central[1].

Diagnóstico laboratorial

Uma vez que não é possível isolar o *T. pallidum* pelos meios de cultura habituais, a deteção é normalmente efetuada por métodos imunológicos[1]. No laboratório Clinova são utilizados dois métodos de aglutinação de partículas: o VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) e o TPHA (*Treponema pallidum Hemagglutination Assay*).

O **VDRL** é um teste não treponémico que deteta a presença de anticorpos (reaginas) contra material lipoproteico de células danificadas, e contra cardiolipina de treponemas. O reagente RPR (*Rapid Plasma Reagin*) utiliza uma mistura de lipoproteínas purificadas que incluem cardiolipina, colesterol e lecitina, que vão reagir com as reaginas da amostra. A presença de partículas de carvão permite que a aglutinação seja observada sob a forma de manchas pretas[1].

Estes anticorpos geralmente ocorrem 1 a 4 semanas após o aparecimento do cancro duro. Os títulos vão aumentando e permanecem elevados durante o primeiro ano, após o qual diminuem gradualmente, revertendo para negativo em 25% dos pacientes. Uma vez que o teste não é específico, podem ocorrer falsos positivos em hepatites agudas, outras infeções virais, na gravidez, ou em doenças do tecido conjuntivo[1].

O **TPHA** é um teste semi-quantitativo de pesquisa dos anticorpos anti-*Treponema pallidum* no soro humano por hemaglutinação indireta. É baseado em eritrócitos sensibilizados com antigénios de *T. pallidum* da estirpe Nichols, em que o contacto com diluições crescentes da amostra permite avaliar o título dos anticorpos presentes. A presença de um extrato de *Treponema* de Reiter permite a absorção dos anticorpos dirigidos contra treponemas não patogénicos. Na presença de anticorpos anti-*T. pallidum* os eritrócitos agregam, formando uma névoa sobre o poço da microplaca[1].

Os anticorpos específicos desenvolvem-se na sífilis primária e pode ser detetados por toda a vida do paciente. O TPHA é efetuado como teste confirmatório para resultados de VDRL positivos, sendo considerado positivo um título de 1:80[1,2].

8. Reação de Waller-Rose

O teste de Waller-Rose é um teste de aglutinação em placa utilizado para a deteção de fatores reumatóides (FR) de classe IgM no soro humano. Os fatores reumatóides são anticorpos dirigidos contra a porção Fc da molécula de IgG. A produção destes anticorpos encontra-se associada à artrite reumatóide. Não são no entanto específicos desta doença, podendo ocorrer em infeções crónicas ou noutras condições inflamatórias sistémicas[1,4].

A reação de Waller-Rose consiste na aglutinação de uma suspensão estabilizada de hemácias de carneiro, sensibilizadas com γ-globulinas de coelho anti-hemácias de carneiro, quando na presença de FR existentes no soro do doente. A reação é positiva em 80% das poliartrites reumatóides após 2 anos de evolução[2].

9. Imunoglobulina E total

A hipersensibilidade de tipo I, que agrupa a anafilaxia e as doenças atópicas, caracteriza-se por uma produção excessiva de imunoglobulinas do tipo E (IgE). Estas IgE sensibilizam os mastócitos e os granulócitos basófilos que, sob sua influência, rompem os grânulos libertando os mediadores implicados na reação alérgica. A presença de IgE constitui assim a substância chave como prova da presença de sensibilização alérgica atópica[2,4].

Tipicamente são observados níveis consideravelmente elevados de IgE totais em indivíduos com distúrbios alérgicos, como dermatite atópica e asma alérgica. No entanto, taxas elevadas podem também ocorrer nas parasitoses, nos linfomas, na sarcoidose e em certas doenças de imunodeficiência. O doseamento das IgE séricas totais constitui por isso apenas um elemento de orientação, devendo ser confrontado com os dados clínicos[2,4].

Conclusões

A realização do estágio em análises clínicas no laboratório Clinova possibilitou-me, além da aquisição de novos conhecimentos, aprofundar os conhecimentos teóricos que adquiri ao longo do mestrado em análises clínicas, e aplicá-los à prática laboratorial.

No que respeita à área da Microbiologia o estágio proporcionou-me a prática de sementeiras de produtos biológicos, a identificação de agentes patogénicos e a interpretação dos respetivos antibiogramas. A observação ao microscópio dos diversos produtos biológicos permitiu-me identificar células, bactérias e parasitas. Desta forma foi possível aplicar os conhecimentos da etiologia e patogénese dos microrganismos, adquiridos ao longo do mestrado. Nesta secção do laboratório apenas posso apontar como condicionante o facto de não possuir uma câmara de fluxo laminar, uma vez que trabalhar ao bico de Bunsen constitui um maior risco para o operador.

Nas áreas de Bioquímica, Hematologia e Imunologia este estágio foi uma mais valia, uma vez que me permitiu trabalhar com diferentes analisadores, tomando conhecimento de diferentes métodos de análise e os seus fundamentos, e me possibilitou ganhar experiência tanto a nível de execução como de interpretação e validação dos resultados. A interpretação dos resultados nestas áreas requer frequentemente a avaliação do processo do doente no geral, incluindo resultados de vindas anteriores, e envolvendo para isso todas as outras áreas, o que constituiu um excelente desafio.

O laboratório Clinova, numa perspetiva de melhoria contínua, apostou no desenvolvimento de algumas medidas no sentido de melhorar a qualidade do serviço fornecido. Nesse sentido foram implementados novos equipamentos, processo no qual tive a oportunidade de participar ativamente.

Tanto o controlo de qualidade interno como a avaliação externa da qualidade provaram ser uma ferramenta primordial na realização de ensaios clínicos. Nesta vertente gostaria de

deixar a sugestão de aquisição de um programa informático de controlo de qualidade interno. Este permitiria funcionar dentro de uma média móvel de controlos mais apertada em relação aos valores do fornecedor, aumentando a precisão dos resultados.

A realização deste estágio permitiu-me assim adquirir uma visão global de um laboratório de análises clínicas e da sua aplicabilidade à clínica. Mostrou-me o papel primordial que o Técnico Superior representa em todo o processo, tornando-me numa melhor profissional.

Referências bibliográficas

1. McPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. – *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21st ed.: Elsevier, 2007.

2. CAQUET, René – *Guia Prático Climepsi de Análises Clínicas*. Lisboa: Climepsi, 2004.

3. *Sysmex Operator's Manual: Automated Hematology Analyzer XT-2000i Instructions for Use*. Sysmex Corporation: Kobe, 2006.

4. RAVEL, Richard – *Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais*. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997.

5. BAIN, Barbara J. – *Células Sanguíneas: um Guia Prático*. 2ª ed., Porto Alegre: Artmed, 1997.

6. *ADAMS HA-8160 Operating Manual*. A. Menarini Diagnostics Division, Arkray Inc., 2002.

7. *Manual do Operador: Test 1*. Rev. 11, Alifax S.P.A., 2001.

8. COELHO, Tiago Henriques; MOREIRA, Adelino Leite – *Função Hemostática e sua Avaliação*. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2001.

9. FERREIRA, Cláudia Natália [et al.] – O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010. **32**(5):416-421.

10. DOUGALD, Hoffman M. – A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001. Feb; **85**: 958-965.

11. *Sysmex CA-500 Operator's Manual*. Sysmex Corporation, KOBE, 2006.

12. FERREIRA, A. Walter; ÁVILA, Sandra L. M. – *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996.

13. *Manual do Operador: Immulite 2000*. Rev. D, Siemens Healthcare Diagnostics Products Lda, 2001.

14. *Manual do Operador: ADVIA Centaur Immunoassay System*. Rev. W., Bayer Diagnostics, 2006.

15. *Manual do Operador: VIDAS*. Rev. 2, BioMérieux, 1994.

16. MILLER, Otto; GONÇALVES, R. Reis – *Laboratório para o Clínico*. 8ª ed., São Paulo: Atheneu, 1999.

17. BARTOLOMÉ, A. – *Manual AB de Diagnóstico y Laboratorio*. Madrid: AB Diagnóstika, 1999.

Anexos

ANEXO I – Valores de referência das análises hematológicas efetuadas no Clinova.

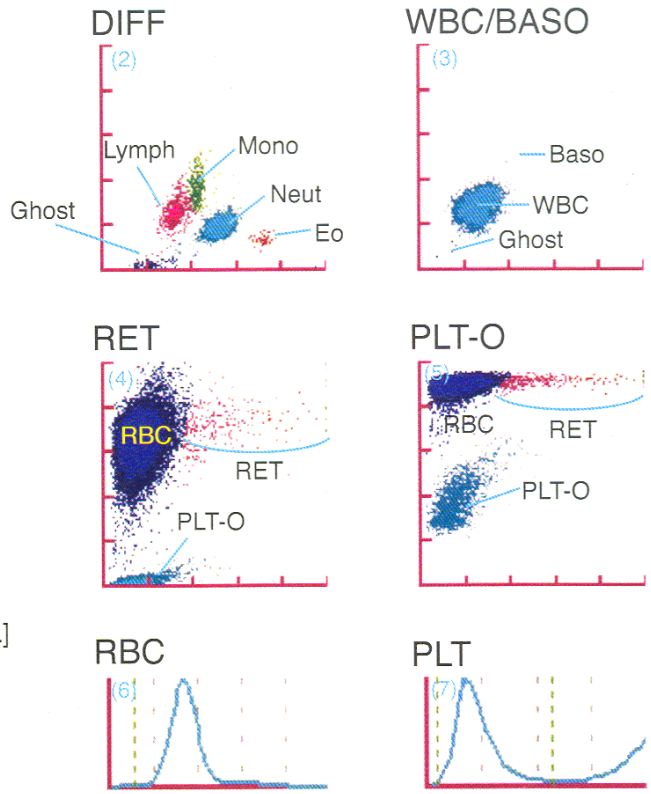
Parâmetro	Intervalo	Sexo	Valores de referência
Fibrinogénio (g/L)	Todos	Todos	1,5 – 4,5
Hemoglobina A_2 (%)	Todos	Todos	< 3,5
Hemoglobina F (%)	Até 4 semanas	Todos	> 80,0
	Até 5 meses	Todos	< 10,0
	> 5 meses	Todos	< 2,0
Hemograma			
Eritrócitos (milhão/mm^3)	Até 3 anos	Todos	3,6 – 5,2
	3 a 5 anos	Todos	3,7 – 5,7
	5 a 10 anos	Todos	3,9 – 4,5
	> 10 anos	Feminino	4,0 – 5,4
	> 10 anos	Masculino	4,5 – 6,3
Hemoglobina (g/dL)	Até 3 anos	Todos	10,8 – 12,8
	3 a 5 anos	Todos	10,7 – 14,7
	5 a 10 anos	Todos	11,0 – 15,0
	> 10 anos	Feminino	12,0 – 16,0
	> 10 anos	Masculino	14,0 – 18,0
Hematócrito (%)	Todos	Feminino	35,0 – 47,0
	Todos	Masculino	40,0 – 54,0
VGM (fL)	Até 12 anos	Todos	77,0 – 91,0
	> 12 anos	Todos	82,0 – 99,0
HGM (pg)	Até 12 anos	Todos	24,0 – 30,0
	> 12 anos	Todos	27,0 – 33,0
CHGM (g/dL)	Até 12 anos	Todos	33,0 – 38,0
	> 12 anos	Todos	32,0 – 36,0
RDW (%)	Todos	Todos	< 14,9
Leucócitos (milhar/mm^3)	Até 2 anos	Todos	6,0 – 17,0
	2 a 4 anos	Todos	5,5 – 15,5
	2 a 6 anos	Todos	5,0 – 14,5
	6 a 12 anos	Todos	4,5 – 13,5
	12 a 16 anos	Todos	4,5 – 13,0
	16 a 18 anos	Todos	4,5 – 12,5
	> 18 anos	Todos	4,0 – 10,0

Parâmetro	Intervalo	Sexo	Valores de referência
Hemograma			
Neutrófilos (%)	Até 1 ano	Todos	17,0 – 60,0
	> 1 ano	Todos	40,0 – 60,0
Eosinófilos (%)	Até 1 ano	Todos	1,0 – 5,0
	> 1 ano	Todos	1,0 – 6,0
Basófilos (%)	Todos	Todos	0,0 – 2,0
Linfócitos (%)	Até 1 ano	Todos	20,0 – 70,0
	Até 12 anos	Todos	25,0 – 50,0
	> 12 anos	Todos	20,0 – 45,0
Monócitos (%)	Até 1 ano	Todos	1,0 – 11,0
	Até 12 anos	Todos	1,0 – 6,0
	> 12 anos	Todos	4,0 – 13,0
Reticulócitos (%)	Todos	Todos	0,5 – 2,0
Plaquetas (milhar/mm^3)	Todos	Todos	150,0 – 400,0
Tempo de Protrombina			
Tempo (s)	Todos	Todos	10,4 – 12,6
Taxa (%)	Todos	Todos	70,0 – 130,0
INR	Todos	Todos	1,0
TTPA (s)	Todos	Todos	22,7 – 31,8
VS (mm/hora)	Até 50 anos	Feminino	< 25,0
	> 50 anos	Feminino	< 30,0
	Até 50 anos	Masculino	< 15,0
	> 50 anos	Masculino	< 20,0

ANEXO II – Folha de resultados de um hemograma efetuado no Sysmex XT-2000i.

(1)

WBC	7.25	[10^9/L]		
RBC	3.97	[10^{12}/L]		
HGB	115	[g/L]		
HCT	32.4	[%]		
MCV	81.6	[fL]		
MCH	29.0	[pg]		
MCHC	355	[g/L]		
PLT	271	[10^9/L]		
RDW-SD	52.3	[fL]		
RDW-CV	17.0	[%]		
PDW	10.1	[fL]		
MPV	9.2	[fL]		
P-LCR	19.0	[%]		
PCT	0.25	[%]		
NEUT	5.65	[10^9/L]	78.1	[%]
LYMPH	1.04	[10^9/L]	14.3	[%]
MONO	0.46	[10^9/L]	6.3	[%]
EO	0.09	[10^9/L]	1.2	[%]
BASO	0.01	[10^9/L]	0.1	[%]
RET	1.36	[%]	54.0	[10^9/L]
IRF	12.3	[%]		
LFR	87.7	[%]		
MFR	11.2	[%]		
HFR	1.1	[%]		



(8) WBC IP Message(s)

(9) RBC/RET IP Message(s)

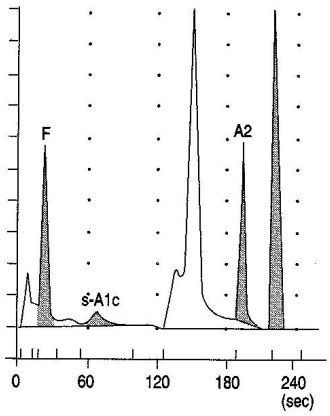
(10) PLT IP Message(s)

ANEXO III – Cromatograma de uma amostra patológica, obtido no ADAMS HA-8160, mostrando elevação das hemoglobinas F e A_2 e presença de hemoglobina S ou C (S/C Window).

********* HA-8160 VX.XX *********
2001-03-15 19:04 PORT No.0001
MEAS No. 0001

HbA1c 4.6 % HbF 6.2 %
HbA1 8.9 % HbA2 5.9 %

		Sec	Area	%
P1		10	1131	3.0
P2		15	510	1.3
P3	F	24	3541	6.2
P4	L-A1c	44	596	1.6
P5	s-A1c	69	1736	4.6
P6	A0	150	34011	59.6
P7	A2	194	3398	5.9
P8	S/C Window	223	12187	21.3
Total			57110	



ANEXO IV – Valores de referência das análises imunológicas efetuadas no Clinova.

Parâmetro	Sexo	Valores de referência
α-fetoproteína (UI/mL)	Todos	< 7,0
β-hCG (mUI/mL)	Todos	< 10,0
	Grávidas	
	0,2–1 semana	5,0 – 50,0
	1–2 semanas	50,0 – 500,0
	2–3 semanas	100,0 – 5.000,0
	3–4 semanas	500,0 – 10.000,0
	4–5 semanas	1000,0 – 50.000,0
	5–6 semanas	10.000,0 – 100.000,0
	6–8 semanas	15.000,0 – 200.000,0
	2–3 meses	10.000,0 – 100.000,0
Ac antiperoxidase (UI/mL)	Todos	< 35,0
Ac antitiroglobulina (UI/mL)	Todos	< 40,0
Ácido fólico (ng/mL)	Todos	≥ 5,4
CA 125 (U/mL)	Todos	< 30,2
CA 15-3 (U/mL)	Todos	< 30,0
CA 19-9 (U/mL)	Todos	< 33,0
CEA (ng/mL)	Todos	Não fumadores: < 4,6
		Fumadores: < 10,0
Estradiol (pg/mL)	Feminino	
	Fase folicular	< 160,0
	Ovulação	34,0 – 400,0
	Fase luteínica	27,0 – 246,0
	Menopausa	< 90,0
	Masculino	< 56,0
Ferritina (ng/mL)	Feminino	10,0 – 291,0
	Masculino	22,0 – 322,0
FSH (mUI/mL)	Feminino	
	Fase folicular	2,5 – 10,2
	Ovulação	3,4 – 33,4
	Fase luteínica	1,5 – 9,1
	Menopausa	23,0 – 116,3
	Masculino	1,4 – 18,1

Parâmetro	Sexo	Valores de referência

IgE total (UI/mL)	Todos	
	Até 1 ano	< 29,0
	1 – 2 anos	< 49,0
	2 – 3 anos	< 45,0
	3 – 9 anos	< 52,0
	> 9 anos	< 87,0
LH (mUI/mL)	Feminino	
	Fase folicular	1,9 – 12,5
	Ovulação	8,7 – 76,3
	Fase luteínica	0,5 – 16,9
	Menopausa	15,9 – 54,0
	Masculino	1,5 – 9,3
Paratormona (pg/mL)	Todos	14,0 – 72,0
Progesterona (ng/mL)	Feminino	
	Fase folicular	0,15 – 1,46
	Ovulação	0,48 – 1,72
	Fase luteínica	4,44 – 28,0
	Menopausa	< 0,73
	Masculino	0,28 – 1,22
Prolactina (ng/mL)	Feminino	2,8 – 29,5
	Masculino	2,1 – 17,7
PSA livre/PSA total (razão)	Masculino	> 0,13 em indivíduos saudáveis e com bom prognóstico
PSA total (ng/mL)	Masculino	< 4,0
T_3 total (nmol/L)	Todos	1,3 – 2,6
T_3 livre (pmol/L)	Todos	2,76 – 6,45
T_4 total (nmol/L)	Todos	58,0 – 161,0
T_4 livre (pmol/L)	Todos	11,5 – 22,7
Testosterona plasmática (ng/mL)	Feminino	0,1 – 0,9
	Masculino	3,0 – 10,6
Tiroglobulina (ng/mL)	Todos	0,73 – 84,0
TSH (mcUI/mL)	Todos	0,4 – 4,0
Vitamina B_{12} (pg/mL)	Todos	211,0 – 911,0

ANEXO V – Valores de referência da serologia de infeções víricas e parasitárias efetuadas no Clinova.

Citomegalovírus		
IgG (IU/mL)	Negativo	< 0,9
	Equívoco	≥ 0,9 e < 1,1
	Positivo	≥ 1,1
IgM (IU/mL)	Negativo	< 0,9
	Equívoco	≥ 0,9 e < 1,1
	Positivo	≥ 1,1
Interpretação	IgG (-) IgM (+)	Estado precoce
	IgG (+) IgM (+)	Infeção recente
	IgG (+) IgM (-)	Imune
	IgG (-) IgM (-)	Suscetível
HAV		
IgG (mIU/mL)	Negativo	< 20,0
	Positivo	≥ 20,0
IgM (índice)	Negativo	< 0,80
	Equívoco	≥0,80 e < 1,20
	Positivo	≥ 1,20
HBV		
AgHBe (índice)	Negativo	< 0,1
	Positivo	≥ 0,1
Anti-HBe (índice)	Negativo	≥ 0,5
	Equívoco	≥0,4 e < 0,5
	Positivo	< 0,4
AgHBs (índice)	Negativo	< 1,0
	Positivo	≥ 1,0
Anti-HBs (mIU/mL)	Negativo	< 10
	Positivo	≥ 10
Anti-HBc total (índice)	Negativo	< 0,85
	Equívoco	≥ 0,85 e < 1,15
	Positivo	≥ 1,15
Anti-HBc IgM (PEIU/mL)	Negativo	< 5
	Equívoco	≥ 5 e < 10
	Positivo	≥ 10
HCV (U/mL)	Positivo	≥ 1,0
HIV (índice)	Positivo	≥ 1,0

Rubéola		
IgG (IU/mL)	Negativo	< 5,0
	Equívoco	≥5,0 e < 10,0
	Positivo	≥ 10,0
IgM (IU/mL)	Negativo	< 0,9
	Positivo	≥ 1,1
Interpretação	IgG (-) IgM (+)	Estado precoce
	IgG (+) IgM (+)	Infeção recente
	IgG (+) IgM (-)	Imune
	IgG (-) IgM (-)	Suscetível
Toxoplasmose		
IgG (IU/mL)	Negativo	< 6,5
	Equívoco	≥6,5 e < 8,0
	Positivo	≥ 8,0
IgM (IU/mL)	Negativo	< 0,9
	Positivo	≥ 1,1
Interpretação	IgG (-) IgM (+)	Estado precoce
	IgG (+) IgM (+)	Infeção recente
	IgG (+) IgM (-)	Imune
	IgG (-) IgM (-)	Suscetível