

Adriana Filipa Vieira Lisboa

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Ricardo Castro e pela Professora Doutora Cristina Luxo e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Adriana Filipa Vieira Lisboa

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Ricardo Castro e pela Professora Doutora Cristina Luxo e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	ix
I.INTRODUÇÃO	1
II.CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO	3
III.HEMATOLOGIA	5
1. HEMATOPOIESE	5
1.1. Esfregaço de Sangue Periférico	6
2. HEMOGRAMA	7
2.1. Auto-Analizador	8
2.2. Observação microscópica do esfregaço de sangue periférico	9
2.2.1. Alterações morfológicas mais comuns na Série Vermelha	9
2.2.2. Alterações morfológicas na Série Branca	11
2.2.3. Alterações morfológicas mais comuns nas Plaquetas	12
2.2.4. Inclusões nos Eritrócitos	12
2.3. Patologias das células sanguíneas	12
2.3.1. Patologia dos glóbulos vermelhos	13
2.3.2. Alterações dos leucócitos	16
2.3.3. Patologias associadas à morfologia	17
3. CITOMETRIA DE FLUXO	19
4. HEMOGLOBINA	20
5. MEDULOGRAMA	20
6. LÍQUIDOS E LAVADOS BRONCOALVEOLARES	21
IV.IMUNOLOGIA	23
1. SEROLOGIA INFECIOSA	23
1.1. Liaison	23
1.2. Triturus	26
1.3. Imunofluorescência Indireta	26
2. ESTUDO DE PROTEÍNAS	28
2.1. Proteinogramas	28
2.2. Imunofixação	30
2.3. Pesquisa de bandas oligoclonais	31
3. AUTOIMUNIDADE	32
3.1. Doenças autoimunes sistêmicas	33

3.2. Vasculites autoimunes	36
3.3. Doenças autoimunes hepáticas	37
3.4. Doenças inflamatórias intestinais	38
3.5. Estudo de anemias	40
4. ALERGIAS	40
V.BIOQUÍMICA	41
VI.MICROBIOLOGIA	43
VII.CONCLUSÃO	47
VIII.BIBLIOGRAFIA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da hematopoiese	5
Figura 2: Esfregaço de Sangue Periférico.....	6
Figura 3: Princípio de Coulter	8
Figura 4: Alterações morfológicas que podem surgir na série vermelha.....	10
Figura 5: Causas de anemias microcíticas e hipocrômicas	13
Figura 6: Exemplo de amostras positivas em IFI.....	28
Figura 7: Proteinograma	29
Figura 8: Imunofixações séricas em gel de agarose	30
Figura 9: Análise de resultados de pesquisa de bandas oligoclonais.....	32
Figura 10: Exemplos de padrões ANA por IFI.....	34
Figura 11: Padrões de fluorescência ANCA	37
Figura 12: Dispersão das magnitudes biológicas	41
Figura 13: Etapas pré-analítica, analítica e pós-analítica de uma amostra.	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Equipamentos do Serviço de Patologia Clínica	4
Tabela 2: Parâmetros de um hemograma.	7
Tabela 3: Classificação de anemias.....	13
Tabela 4: Alterações no número de leucócitos e possíveis causas associadas.	17
Tabela 5: Perfil de autoanticorpos e patologia autoimune associada.	33
Tabela 6: Perfis de antígenos para os quais se pesquisam autoanticorpos.....	35

ABREVIATURAS

<u>ADN</u>	Ácido desoxirribonucleico
<u>ARN</u>	Ácido ribonucleico
<u>ANA</u>	Anticorpos anti-nucleares
<u>ANCA</u>	Anticorpos anti-neutrófilos citoplasmáticos
<u>AOMP</u>	Ataxia Opsoclonus Myclonus Paraneoplásica
<u>APCA</u>	Anticorpos anti-células parietais
<u>ASCA</u>	Anticorpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<u>ASMA</u>	Anticorpos anti-músculo liso
<u>CCP</u>	Péptido C Citrulinado
<u>CHL</u>	Centro Hospitalar de Leiria
<u>CMHC</u>	Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular
<u>CMV</u>	Citomegalovírus
<u>CoA</u>	Co-enzima A
<u>DPC</u>	Degeneração Cerebelar Paraneoplásica
<u>EBV</u>	Vírus Epstein Barr
<u>EDTA</u>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<u>ELISA</u>	Ensaio de Imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
<u>ESP</u>	Esfregaço de Sangue Periférico
<u>FEIA</u>	Imunoensaio enzimático de fluorescência (<i>Fluorescence Enzyme Immunoassay</i>)
<u>FI</u>	Fator intrínseco
<u>FTA-ABS</u>	Anticorpos treponémicos fluorescentes (<i>Fluorescent treponema antibody absorbed</i>)
<u>G6PD</u>	Glucose-6-Fosfato-Desidrogenase
<u>Hb</u>	Hemoglobina
<u>HCT</u>	Hematócrito
<u>HCM</u>	Hemoglobina Corpuscular Média
<u>HGB</u>	Hemoglobina
<u>IACS</u>	Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde
<u>IFI</u>	Imunofluorescência Indireta
<u>Ig</u>	Imunoglobulina
<u>LBA</u>	Lavado Broncoalveolar
<u>LC</u>	Anticorpos citosólicos de fígado (<i>Liver cytosolic antibodies</i>)

<u>LCR</u>	Líquido Cefalorraquídeo
<u>LDH</u>	Lactato Desidrogenase
<u>LED</u>	Díodo Emissor de Luz (<i>Light Emmiting Diode</i>)
<u>LKM</u>	<i>Liver, Kidney Microsomal</i>
<u>LP</u>	Líquido pleural
<u>MGG</u>	May-Grunwald-Giemsa
<u>MGUS</u>	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
<u>MO</u>	Medula Óssea
<u>NK</u>	Natural Killer
<u>PK</u>	Fosfatase Alcalina
<u>RDW</u>	Índice de variação dos eritrócitos (<i>Red Cell Distribution Width</i>)
<u>RPR</u>	<i>Rapid Plasm Reagin</i>
<u>SIDA</u>	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
<u>SPC</u>	Serviço de Patologia Clínica
<u>TACSP</u>	Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública
<u>THF</u>	Tetrahydrofolato
<u>TIBC</u>	Capacidade total de ligação ao ferro (<i>Total iron binding capacity</i>)
<u>TPHA</u>	Teste de hemaglutinação de <i>Treponema Pallidum</i> (<i>Treponema Pallidum Haemagglutination</i>)
<u>TSS</u>	Técnico Superior de Saúde
<u>VCA</u>	Antigénio da cápside viral (<i>Viral Capsid Antigen</i>)
<u>VCS</u>	Volume, Condutividade, Dispersão (<i>Volume, Conductivity, Scatter</i>)

RESUMO

O presente relatório foi realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas, e reporta o estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Leiria.

Ao Serviço de Patologia Clínica chega diariamente um elevado número de amostras, cujo processamento está sob uma política de controlo de qualidade. O trabalho de um técnico superior passa por ter espírito crítico para avaliar os resultados tendo em conta as condições do processamento das amostras, a informação clínica e histórico dos doentes, e o enquadramento nas diferentes áreas laboratoriais. Só assim é possível prestar um serviço de qualidade no complemento ao diagnóstico clínico.

Neste relatório refiro o trabalho realizado ao longo de seis meses nas diferentes áreas laboratoriais, abordando com maior detalhe as áreas de Hematologia e Imunologia.

ABSTRACT

The present report was made in the context of the Master degree in Clinical Analysis, and refers to the training that took place in the Clinical Pathology laboratory at Centro Hospitalar de Leiria.

Every day the Clinical Pathology laboratory receives a big number of biological samples that are handled under a strict quality control policy. In order to evaluate the results it is important to have critical thinking, always having in mind the way samples are handled, clinical information and history of the patient. This way it is possible to provide quality results that help in the patients diagnose.

In this report I mention what I have learned during the six months of training, focusing on two areas of the laboratory: Hematology and Immunology.

I. INTRODUÇÃO

As análises clínicas são uma área abrangente que compreende vários domínios científicos que estão na base da prevenção, diagnóstico e monitorização da doença. De modo a obter resultados de qualidade e confiança tem que se exigir rigor nas três etapas que envolvem o processo analítico, sendo estas a fase pré-analítica, a fase analítica e a fase pós analítica. Qualquer erro em cada uma dessas etapas poderá afetar o resultado obtido e em último caso trazer consequências para o doente.

O presente relatório foi realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e reporta o estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Leiria. Este estágio teve como objetivo o aprofundamento e aplicação de conhecimentos teóricos e práticos apreendidos durante o mestrado, na realidade diária de um laboratório de meio hospitalar.

O estágio teve a duração de seis meses, de dezembro de 2015 a maio de 2016. Durante estes meses tive a oportunidade de integrar a rotina laboratorial passando seis semanas em cada uma das áreas laboratoriais do Serviço de Patologia Clínica, sendo estas Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia.

Neste relatório menciono o trabalho realizado nas diferentes áreas laboratoriais, abordando com maior detalhe o que se realiza nos laboratórios de Hematologia e Imunologia.

II. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Centro Hospitalar de Leiria (CHL) é constituído pelo Hospital de Santo André, Hospital Bernardino Lopes de Oliveira (Alcobaça) e pelo Hospital Distrital de Pombal. O Serviço de Patologia Clínica (SPC) é comum a estes hospitais e está centralizado no Hospital de Santo André em Leiria.

O diretor do serviço de Patologia Clínica é o Doutor Ricardo Castro, médico patologista, sendo que este serviço é também composto por Técnicos Superiores de Saúde (TSS), Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública (TACSP), Assistentes Operacionais e Assistentes Técnicos.

O serviço de Patologia Clínica é constituído por uma secretaria onde se fazem as marcações de colheitas e atendimento aos utentes, pela sala de espera, por quatro gabinetes onde os TACSP fazem as colheitas e pelos laboratórios. Existem quatro áreas laboratoriais, cada uma sobre a responsabilidade de diferentes TSS ou médico patologista. O laboratório de Hematologia que tem como responsável a Doutora Sandrine Mendes, o laboratório de Imunologia tem como responsáveis a Doutora Yuliya Sydor e Doutora Filipa Silva, o laboratório de Microbiologia tem como responsável a Doutora Gina Marrão e o laboratório de Bioquímica tem como responsáveis a Doutora Ana Paquim e o Doutor Jorge Pinheiro.

Para dar resposta ao elevado e diversificado número de análises pedidas o laboratório conta com diversos equipamentos automatizados que facilitam o processamento das amostras e diminuem os erros laboratoriais - Tabela I.

EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA

<i>Facs Calibur</i> - BD Biosciences	Citometria de fluxo
<i>Facs Lyse Wash</i> - BD Biosciences	Preparação de amostras para o <i>Facs Calibur</i>
<i>Cappilarys 2 Flex Piercing</i> - Sebia	Electroforese em capilares.
<i>Ves-MATIC 30</i> - Menarini	Analizador da velocidade de sedimentação globular
<i>Aerospray PRO 7151</i> - Wescor	Coloração automática de lâminas
<i>UniCel DxH800</i> - Beckman Coulter	Impedância
<i>ACLTOP 500</i> - Werfen	Turbidimetria, Colorimetria e Imunoensaio

EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA

Automate 2500 - Beckman Coulter	Triagem automática - Pré- Analítica
<i>UniCel Dxl 800</i> - Beckman Coulter	Quimioluminescência
<i>AU 2700</i> - Beckman Coulter	Imunoensaio por Fotometria
<i>Access 2</i> - Beckman Coulter	Quimioluminescência
<i>ABL 800 FLEX</i> - Radiometer	Potenciometria
Aution MAX AX-4030 - Menarini	Reflectância
<i>COBAS e411</i> - Roche	Electroquimioluminescência
Triage - Alere	Imunoensaio de fluorescência

EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

<i>Bact/ ALERT 3D</i> - Biomérieux	Análise da produção de CO ₂
<i>VITEK 2</i> - Biomérieux	Leitura por fluorescência de testes bioquímicos
<i>PREVI Color</i> - Biomérieux	Coloração automática de lâminas pela técnica de Gram
<i>ATB</i> - Biomérieux	Turbidimetria

EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA

<i>Liaison</i> - DiaSorin	Quimioluminescência
<i>Triturus</i> - Grifols	ELISA
<i>QUANTA-Llyser</i> - Werfen	Preparação de lâminas para IFI
<i>ImmunoCAP 250</i> - Phadia	FEIA
<i>HYDRASYS 2</i> - Sebia	Electroforese em gel de agarose
<i>EUROBlotMaster</i> - Euroimmun	Imunoblotting
<i>IMMAGE 800</i> - Beckman Coulter	Nefelometria e Turbidimetria

Tabela 1: Equipamentos do Serviço de Patologia Clínica e breve descrição da metodologia.

III. HEMATOLOGIA

Neste sector faz-se o estudo das células sanguíneas. A principal amostra biológica que chega ao sector de hematologia é sangue, mas neste são também analisados líquidos cefalorraquídeos (LCR), líquidos sinoviais, líquidos pleurais (LP), líquidos ascíticos, lavados broncoalveolares (LBA) e medula óssea (MO).

I. HEMATOPOIESE

Para fazer o correto estudo das células sanguíneas é importante saber caracterizar as diferentes células e para isso é necessário conhecer como se formam, diferenciam e maturam, ou seja, é preciso conhecer a hematopoiese - Figura 1.

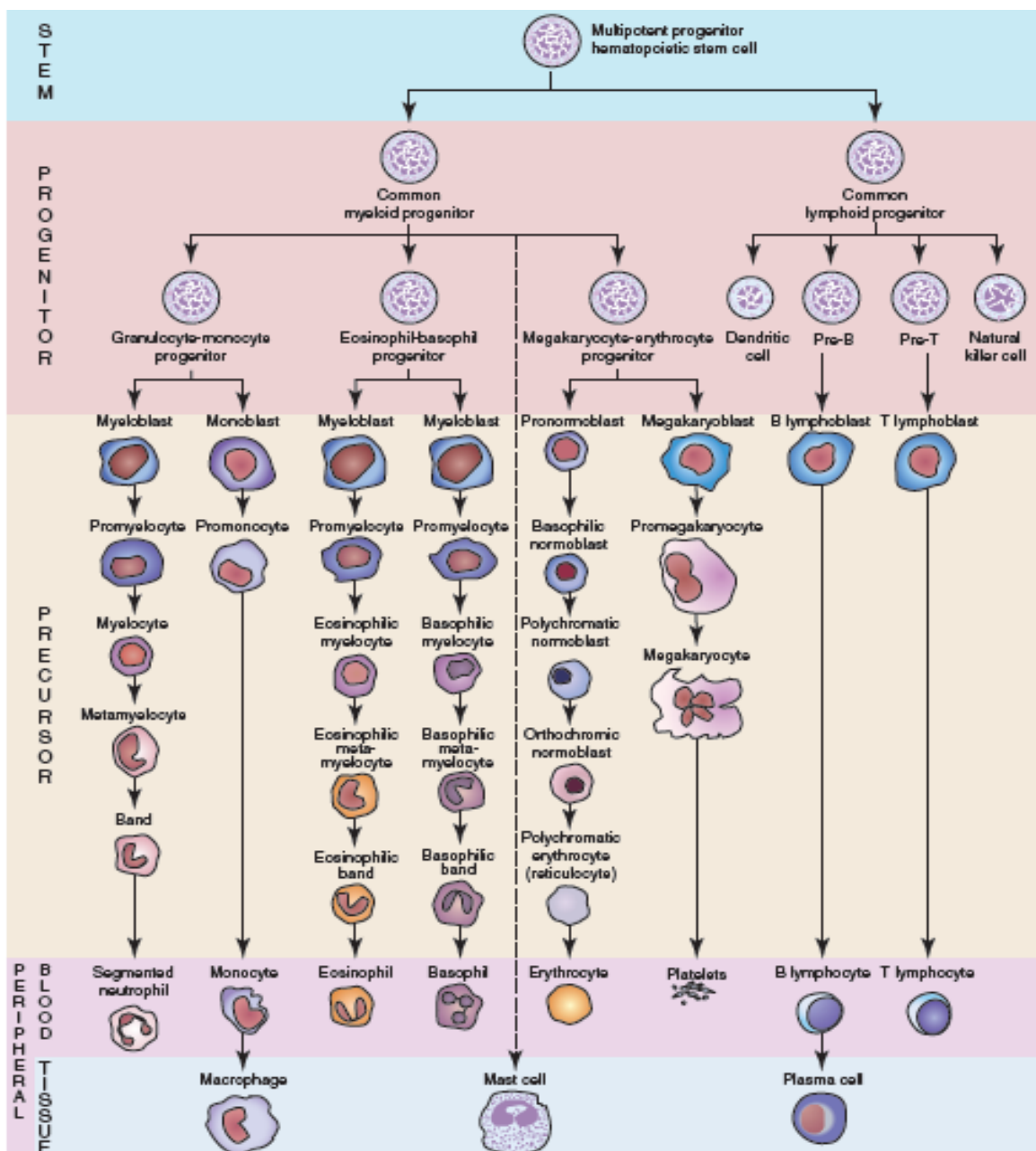


Figura 1: Etapas da hematopoiese. Adaptada de Rodak B., et al - Clinical Hematology Atlas (2013).

A hematopoiese é feita à custa de fatores de crescimento que regulam a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas progenitoras e que regulam a função de células sanguíneas maduras. Em resposta a estes fatores, a célula estaminal pluripotente diferencia-se num precursor mielóide e num precursor linfóide comuns. O precursor linfóide prolifera e diferencia-se em células T, células B e células Natural Killer (NK). O precursor mielóide prolifera e diferencia-se nas linhagens granulocítica, de eosinófilos, de eritrócitos e de megacariócitos. Nos adultos, a hematopoiese acontece sobretudo na medula óssea. [1]

1.1. Esfregaço de Sangue Periférico

Para fazer a análise das células sanguíneas ao microscópio é necessário fazer um esfregaço de sangue periférico (ESP). É importante seguir algumas indicações de modo a fazer-se um ESP que permita uma fácil e correta análise e identificação das células sanguíneas. Para tal deve-se colocar uma gota de sangue total numa das extremidades de uma lâmina e de seguida, com o auxílio de uma segunda lâmina apoiada sobre a gota a cerca de 45° espalhar o sangue ao longo da lâmina, num movimento único e uniforme - Figura 2.a. O ESP deve ficar com o aspeto da Figura 2.b. Isto indica que houve uma boa separação das células e que há uma área apreciável onde as células estão dispostas numa só camada, podendo ser observadas na zona oposta a onde foi colocada a gota inicialmente.

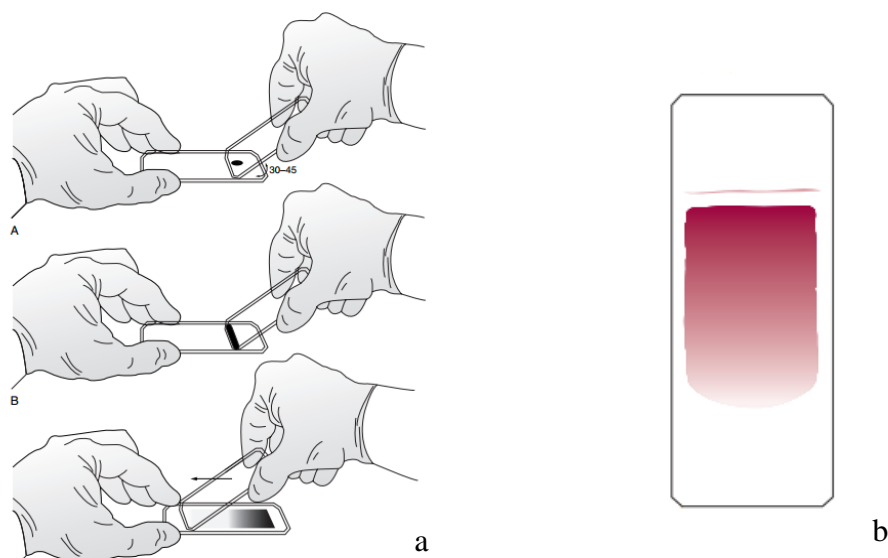


Figura 2: Esfregaço de Sangue Periférico. a) Ilustração de como fazer um ESP; b) Aspeto de um ESP com separação ótima para observação. Adaptada de Rodak B., et al - Clinical Hematology Atlas (2013).

Os ESP devem ser feitos assim que possível de modo a evitar o aparecimento de artefactos tais como a crenação de eritrócitos e a degeneração de leucócitos.

O último passo a fazer antes da observação ao microscópio é corar a lâmina, o que é feito no colorador automático *Aerospray Pro*.

2. HEMOGRAMA

O hemograma é uma análise que quantifica e caracteriza os diferentes tipos de células sanguíneas, permitindo despistar diversas patologias. Os parâmetros determinados no hemograma, e a respetiva descrição, são os seguintes:

<u>Eritrócitos (GV):</u>	Número de eritrócitos por microlitro de sangue.
<i>Hemoglobina (HGB)</i>	Quantidade de hemoglobina por microlitro de sangue.
<i>Hematócrito (HCT)</i>	Percentagem de eritrócitos em relação à massa de sangue.
<i>Volume Corpuscular Médio (VCM)</i>	Cálculo do volume ocupado pelos GV a dividir pelo número total destes.
<i>Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)</i>	Cálculo da HGB a dividir pelo número de GV.
<i>Concentração Média da Hemoglobina Corpuscular (CMHC)</i>	Cálculo da HGB a dividir pelo HCT, multiplicado por 100.
<i>Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos (RDW)</i>	Índice de variação do tamanho dos eritrócitos (anisocitose), em percentagem.
<u>Leucócitos:</u>	Número de leucócitos por microlitro de sangue.
<i>Neutrófilos</i>	Contagem absoluta de neutrófilos e percentagem em relação ao número total de leucócitos.
<i>Linfócitos</i>	Contagem absoluta de linfócitos e percentagem em relação ao número total de leucócitos.
<i>Monócitos</i>	Contagem absoluta de monócitos e percentagem em relação ao número total de leucócitos.
<i>Eosinófilos</i>	Contagem absoluta de eosinófilos e percentagem em relação ao número total de leucócitos.
<i>Basófilos</i>	Contagem absoluta de basófilos e percentagem em relação ao número total de leucócitos.
<u>Plaquetas:</u>	Número de plaquetas por microlitro de sangue.
<i>Volume Plaquetar Médio (VPM)</i>	Cálculo do volume ocupado pelas plaquetas a dividir pelo número total destas.
<i>Distribuição do Diâmetro das Plaquetas (PDW)</i>	Índice de variação do tamanho das plaquetas.

Tabela 2: Parâmetros de um hemograma.

2.1. Auto-Analizador

Para a realização de um hemograma, a colheita de sangue total é feita para um tubo específico de hemograma que contém EDTA como anticoagulante. O hemograma é feito no equipamento *DxH800*. Este é um auto analisador quantitativo hematológico cuja técnica se baseia no princípio de Coulter:

- *Uma suspensão de células sanguíneas atravessa um orifício em simultâneo com uma corrente elétrica. Cada célula ao atravessar o orifício induz uma alteração na impedância do orifício de acordo com o seu tamanho. O sistema conta individualmente as células e fornece a informação da distribuição de acordo com o tamanho de cada célula.* [2]

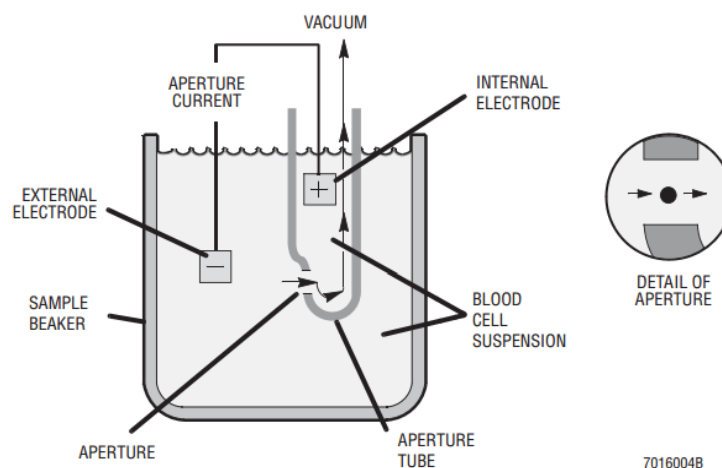


Figura 3: Princípio de Coulter. Adaptado de *UniCel DxH Series with System Manager Software: Instructions for use*, Beckman Coulter.

○ *DxH800* conta e mede as células pela alteração na resistência elétrica que estas, ao estarem num líquido condutor, provocam ao passarem por uma abertura - Figura 3. Cada célula dá origem a um impulso elétrico que é medido, sendo que o tamanho de cada um dos impulsos é proporcional ao volume celular.

○ equipamento prepara as amostras com as soluções necessárias para a análise das células sanguíneas. São adicionados diluentes específicos e para a contagem das células leucocitárias é também adicionado um reagente que lisa os eritrócitos, de modo a que estes não interfiram na análise dos leucócitos. Esta solução contendo eritrócitos lisados é depois aproveitada pelo equipamento para fazer a medição da hemoglobina, através de uma técnica fotométrica.

O DxH800 consegue caracterizar os diferentes tipos de leucócitos através da tecnologia VCS (“Volume, Conductivity, Scatter”). O volume de cada célula é conhecido após ser aplicada uma corrente de baixa frequência. As propriedades condutoras de cada célula após aplicação de uma corrente de alta frequência permitem caracterizar as células de acordo com os diferentes constituintes nucleares, granulares e composição química e, por último a dispersão da luz após fazer incidir um laser permite saber o tamanho da célula. Esta tecnologia permite caracterizar os leucócitos como linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos.

Este equipamento também permite fazer a contagem de reticulócitos com a tecnologia VCS.

Os resultados dos hemogramas são depois analisados e validados pelo TSS responsável pelo sector de hematologia.

2.2. Observação microscópica do esfregaço de sangue periférico

Quando se observam alterações relevantes nos hemogramas, é feito um esfregaço de sangue periférico para observação ao microscópio. Caso se observem alterações estas são reportadas ao clínico.

Por norma os esfregaços são observados ao microscópio da seguinte forma (de acordo com os microscópios disponíveis no laboratório):

- ❖ com a objetiva de 20x: procuram-se agregados plaquetares (principalmente nas zonas finais e laterais do esfregaço), e observam-se alterações das células sanguíneas.
- ❖ com a objetiva de 40x: faz-se a contagem diferencial manual dos leucócitos de maneira a confirmar a fórmula leucocitária dada pelo equipamento, e observam-se alterações das células sanguíneas com maior precisão.
- ❖ com a objetiva de imersão de 100x: procuram-se inclusões nos eritrócitos.

2.2.1. Alterações morfológicas mais comuns na Série Vermelha

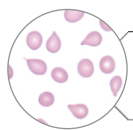
· Anisocitose:

Variabilidade no tamanho dos eritrócitos (poderá ter reflexo no valor de RDW).

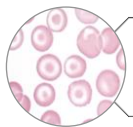
A anisocitose pode resultar da presença de eritrócitos maiores que o normal – macrocitose, eritrócitos mais pequenos que o normal – microcitose, ou dos dois. [3]

As macrocitoses podem ser resultantes de um défice de vitamina B12 e/ou ácido fólico, e as microcitoses poderão ter como causa β -talassémias ou deficiência de ferro, por exemplo. Estas alterações podem ser verificadas no valor de VCM.

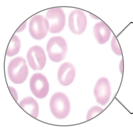
Poiquilocitose: Variabilidade na forma dos eritrócitos. As alterações morfológicas mais comuns e suas causas estão descritas na Figura 4.



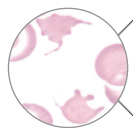
Dacriócitos – Eritrócitos em forma de lágrima. São observados em casos de mielofibrose e hematopoiese extramedular.



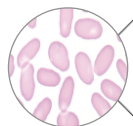
Células em alvo – Eritrócitos com uma área de coloração aumentada no meio da palidez central. Típicos de hepatopatias, icterícia obstrutiva, hemoglobinopatias, talassémia, esplenectomia e deficiência em ferro.



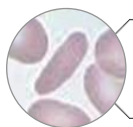
Estomatócitos – Eritrócitos que parecem ter uma fenda. Podem aparecer em casos de hepatopatia, estomatocitose hereditária e alcoolismo.



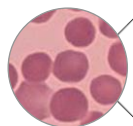
Acantócitos – Eritrócitos com espículas arredondadas. Podem aparecer devido a hepatopatia, abetalipoproteinémia e insuficiência renal.



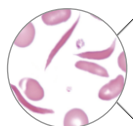
Ovalócitos/Eliptócitos – Eritrócitos com forma oval ou elíptica, respectivamente. Causados por elipcitose ou ovalocitose hereditária, talassemia e anemias.



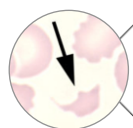
Eritrócitos em bastão/charuto – Eritrócitos típicos em anemia ferropénica.



Esferócitos – Eritrócitos com forma esférica. Associados a esferocitose hereditária, anemias hemolíticas e queimaduras graves.



Drepanócitos – Eritrócitos em forma de foice. Característicos em anemia falciforme.



Fragmentos Eritrocitários – Pequenos fragmentos de eritrócitos com formas irregulares como consequência de stress mecânico, como por exemplo a hemólise devido a válvulas cardíacas.

Figura 4: Alterações morfológicas que podem surgir na série vermelha. Imagens adaptadas de Loffler H., Atlas of Clinical Hematology (2001).

- Roleaux: Eritrócitos em “pilhas de moedas” devido a um aumento na concentração de globulinas ou paraproteínas. Este fenómeno verifica-se em casos de mieloma múltiplo.
- Aglutinação: Aglomerados de eritrócitos. Acontece devido a reações antigénio-anticorpo.
- Hipocromia: Diminuição da coloração dos eritrócitos, devido a uma menor concentração de hemoglobina. Observado frequentemente em anemias ferropénicas.
- Dimorfismo eritrocitário: Presença de populações eritrocitárias com tamanhos/colorações diferentes. As causas poderão ser por exemplo uma anemia ferropénica após administração de ferro, transfusões de sangue, anemia sideroblástica ou deficiência simultânea de ferro e vitamina B12/ácido fólico.
- Policromasia: Eritrócitos com coloração azulada. Significa que são eritrócitos que perderam núcleo há pouco tempo. Aparecem em anemias severas.
- Percursos Eritróides: Podem aparecer eritrócitos nucleados no sangue periférico em casos de anemias.

2.2.2. Alterações morfológicas na Série Branca

- Granulações tóxicas: Hipogranulação ou hipergranulação dos neutrófilos. Típico de displasia e infeções bacterianas, respetivamente.
- Vacuolização dos neutrófilos: típico em infeções bacterianas.
- Segmentação do núcleo: Hiposegmentação ou hipersegmentação dos neutrófilos. Típico de displasia e anemia megaloblástica, respetivamente.
- Presença de precursores: Podem aparecer precursores mielóides ou linfóides. Podem ser consequência de anemia ou síndromes linfoproliferativas ou mieloproliferativas.
- Alterações nos linfócitos: Podem ser observados, por exemplo, linfócitos ativados (pleiomorfismo) – típicos de infeções virais; linfócitos com projeções citoplasmáticas – leucemia de células cabeludas; ou até linfócitos fusiformes – sugestivo de um linfoma esplénico.
- Manchas de gumprecht: Manchas em redor do núcleo de linfócitos, são um artefacto produzido pela fragmentação da cromatina durante a preparação da amostra. ^[4,5]

2.2.3. Alterações morfológicas mais comuns nas Plaquetas

- Agregados plaquetares: Devido ao anticoagulante usado nos tubos de colheita, as plaquetas podem agregar, o que pode resultar numa errada contagem pelo equipamento, dando origem a um hemograma com uma falsa trombocitopenia. Deve-se confirmar a trombocitopenia por observação do ESP.
- Plaquetas gigantes: Perturbação na linhagem de plaquetas, pode fazer com que estas apresentem um tamanho maior que o normal.

2.2.4. Inclusões nos Eritrócitos

- Pontuado basófilo: grânulos basofílicos espalhados pela célula, compostos por ARN desnaturado. Estão presentes em anemias, mielofibrose, hepatopatia, intoxicações por metais pesados, etc.
- Corpos de Howell-Jolly: inclusões citoplasmáticas redondas compostas por ADN remanescente. Estas inclusões são removidas pelo baço, pelo que aparecem no sangue periférico devido a esplenectomia e nos estados hipoesplénicos.^[5]
- Corpos de Pappenheimer: Inclusões basófilas compostas por ferro.
- Formas parasitárias de Plasmodium sp.: para confirmação do resultado do teste de pesquisa de antígeno de *Plasmodium sp.*, diferenciação do tipo de *Plasmodium* e cálculo da taxa de parasitémia.

2.3. Patologias das células sanguíneas

Ao observar uma lâmina é importante saber o que deve ser valorizado. Podem existir alterações das células sanguíneas em todas as amostras de sangue, por isso é importante ter noção: se estamos a observar uma alteração que é reprodutível por todo o esfregaço ou se apenas aparece em alguns campos deste, saber como foi feita a recolha e processamento da amostra, informações sobre o estado clínico do doente e se estamos perante um esfregaço de um recém-nascido, de uma criança, de um adulto, de um idoso ou de uma grávida. Todas estas informações são importantes no momento da análise do esfregaço sanguíneo de modo a saber que alterações devem ser valorizadas e posteriormente reportadas aos clínicos.

2.3.1. Patologia dos glóbulos vermelhos

Uma anemia está definida como uma diminuição dos níveis de hemoglobina abaixo dos valores de referência para uma dada idade e sexo. Por norma, as anemias são secundárias a outras doenças ou estados, como por exemplo, perda de sangue aguda após trauma, perda de sangue crónica, nutrição inadequada, doenças autoimunes crónicas, infeções crónicas, e muitos outros. As anemias estão frequentemente associadas a morfologia anormal dos eritrócitos-Tabela 3. ^[6]

Microcítica e Hipocrómica	Normocítica e Normocrómica	Macrocítica
VGM <80 HGM <27	VGM <80-90 HGM >27	VGM <95
Deficiência em Ferro Inflamação crónica/maligna Talassemia	Anemias hemolíticas Anemia de doenças crónicas Falência medular	Défice de Vitamina B12 Défice de Folato Alterações do metabolismo da vitamina B12 e/ou folato Defeitos na síntese do ADN Anemia sideroblástica

Tabela 3: Classificação de anemias.

Anemias microcíticas e hipocrómicas:

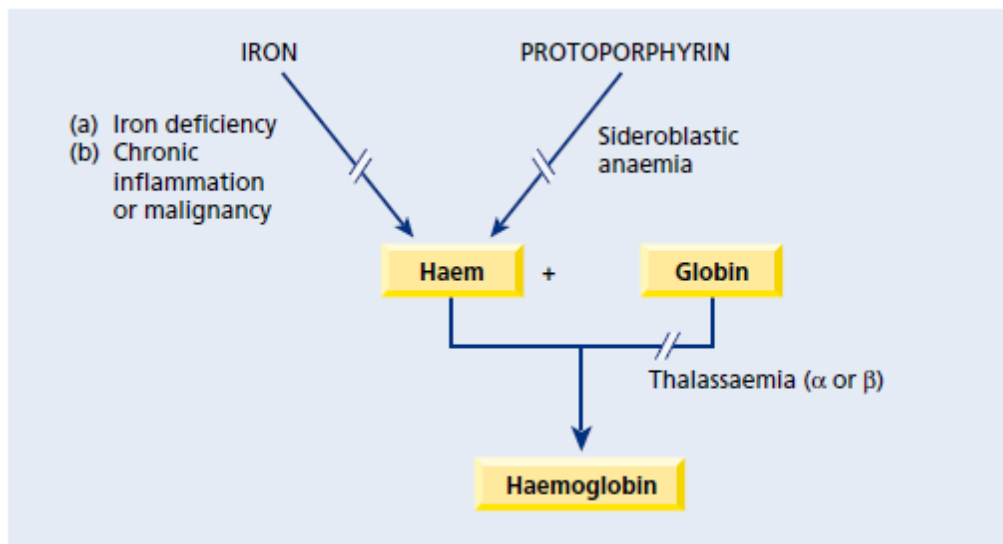


Figura 5: Causas de anemias microcíticas e hipocrómicas. Adaptada de Hoffbrand A., *Essential Haematology*, (2011).

- A principal causa deste tipo de anemias é a deficiência em ferro - Figura 5. Isto pode acontecer em situações tais como: perdas de sangue crónicas - devido a perdas uterinas ou gastrointestinais; aumento das necessidades de ferro – devido a estados como o crescimento ou gravidez; problemas de absorção – devido a gastrectomias ou gastrites autoimunes; ou

dietas pobres em ferro. A deficiência em ferro afeta a síntese de hemoglobina, uma vez que não se vai formar o grupo heme. Num hemograma é possível detetar este tipo de anemia uma vez que além dos valores de hemoglobina baixos, também os valores de VGM e HCM vão estar baixos. Isto reflete-se no esfregaço de sangue onde tipicamente serão observados glóbulos vermelhos mais pequenos e com menor coloração que o normal. Devido a esta alteração dos níveis de ferro, os eritrócitos poderão sofrer alterações na sua morfologia, sendo provável observar eritrócitos em bastão. Policromasia e presença de precursores eritróides também poderão ser observadas, uma vez que há uma tentativa da medula de repor os níveis de hemoglobina, e por isso acabam por chegar ao sangue periférico células da linhagem eritróide imaturas. ^[5,7,8]

Para completar o diagnóstico de uma anemia por deficiência de ferro, podem-se realizar provas bioquímicas tais como: doseamento de ferro sérico, ferritina, saturação de transferrina e determinação do TIBC (todos estes parâmetros deverão estar baixos ao contrário da TIBC).

- Talassémia é uma condição resultante de mutações nos genes das cadeias das globinas que compõem a hemoglobina. Nesta situação a produção de cadeias alfa (α) ou beta (β) poderá estar diminuída ou até mesmo ausente. Isto resulta numa produção desequilibrada de cadeias de globina. As cadeias em excesso acabam por precipitar e acumular nos eritroblastos e eritrócitos, levando à sua destruição. Num esfregaço de sangue periférico é comum observar além da hipocromia e microcitose, células em alvo e pontuado basófilo. ^[5,7]

Anemias normocrómicas e normocíticas:

- O principal tipo são anemias hemolíticas, as quais resultam do aumento da taxa de destruição de eritrócitos. Estas podem ser classificadas como hereditárias ou adquiridas. As formas adquiridas podem ocorrer devido a causas imunes ou traumas, enquanto as formas hereditárias resultam de defeitos da membrana dos eritrócitos – como a esferocitose ou eliptocitose hereditárias; das enzimas eritrocitárias – deficiência de G6PD ou PK; ou de anormalidades da hemoglobina- HbS ou HbC.

Há vários parâmetros que podem ser verificados de modo a completar o diagnóstico de uma anemia hemolítica. Podem procurar-se evidências da destruição de eritrócitos através da alteração de parâmetros bioquímicos, tais como o aumento das bilirrubinas conjugada e não conjugada no soro e aumento de urobilinogénio na urina devidos ao *breakdown* da

hemoglobina, e diminuição da haptoglobina devido à sua saturação com hemoglobina. Há também um aumento de reticulócitos e hiperplasia da linhagem eritróide na medula óssea uma vez que há uma tentativa da medula de repor os níveis normais de glóbulos vermelhos. A morfologia dos eritrócitos também poderá estar alterada, podendo nos esfregaços de sangue periférico ser observados esferócitos, eliptócitos ou fragmentos eritrocitários, consoante o tipo de patologia envolvida.^[7]

Anemias macrocíticas:

- São um grupo de anemias que resultam de uma eritropoiese anormal na qual os glóbulos vermelhos apresentam um tamanho maior que o normal, o que se reflete num valor elevado de VGM.
- As anemias macrocíticas mais comuns são as anemias megaloblásticas. Neste tipo de anemias é possível observar nas células uma assincronia entre a maturação do núcleo em relação ao citoplasma. Isto acontece devido a deficiências na síntese do ADN, que têm como causa principal déficit de vitamina B12 e/ou folato.

A vitamina B12 é necessária à maturação dos eritrócitos e é obtida exclusivamente através da alimentação. Para que seja absorvida tem que se ligar a uma glicoproteína que é produzida pelas células gástricas parietais, o factor intrínseco. A vitamina B12 funciona como uma coenzima para duas reações enzimáticas. É usada na reação de conversão de homocisteína em metionina, como coenzima da metionina sintetase. Para esta reacção é também necessário metil-tetrahydrofolato (metil-THF) - uma molécula resultante da conversão de folatos da dieta - como dador do grupo metil, e que é convertido em tetrahydrofolato (THF). O THF é importante para a formação de precursores dos nucleótidos para síntese de ADN. A segunda reação em que a vitamina B12 é necessária afeta a formação dos glóbulos vermelhos uma vez que esta entra na conversão de metilmalonil coenzima A (CoA) em succinil CoA. Esta última molécula entra no ciclo de Krebs e também na síntese de protoporfirinas, as quais em conjunto com moléculas de ferro formam o grupo heme.^[5,7,9]

Nestas anemias o que se observa num esfregaço de sangue periférico, além de eritrócitos com um volume maior que o normal, são neutrófilos hipersegmentados (com mais de cinco lóbulos) e que podem ter também um volume maior que o normal – macropolicitos.

A bilirrubina não conjugada e a lactato desidrogenase (LDH) poderão estar aumentadas devido à morte de células da medula pelo desequilíbrio causado pela deficiente síntese de ADN. ^[8] A homocisteína poderá ser um marcador mais precoce deste tipo de anemia visto que um aumento desta molécula mostra que não existem os intermediários que permitem a sua conversão em metionina e por isso dá-se a sua acumulação.

Há outras condições que podem levar a deficiência de vitamina B12, tais como anemia perniciosa, uma patologia autoimune em que há produção de anticorpos dirigidos contra a célula parietal ou contra o fator intrínseco; ou outros problemas gástricos ou intestinais que comprometam a normal absorção de nutrientes.

- Anemia sideroblástica é um outro tipo de anemia em que há um aumento dos depósitos de ferro na medula óssea. Define-se pela presença de sideroblastos em anel patológicos na medula óssea. Pode ter várias causas, desde hereditárias a causas adquiridas (malignas ou benignas), mas todas têm em comum a deficiência na formação do grupo heme da hemoglobina. Uma coloração de Perls permite observar os grânulos de ferro dispostos à volta do núcleo dos eritroblastos. ^[5]

- As anemias macrocíticas não megaloblásticas poderão ter diversas causas, entre as quais estão o alcoolismo, gravidez, determinadas drogas, e até mesmo certas patologias como doenças hepáticas, hipotireoidismo, mieloma múltiplo, leucemia ou mielodisplasia.

2.3.2. Alterações dos leucócitos

Ao analisar a contagem de glóbulos brancos pode verificar-se um aumento ou diminuição da produção destas células. Uma diminuição do número de leucócitos no sangue tem a designação de leucopenia e um aumento tem a designação de leucocitose. Em caso de leucocitose podemos ter qualquer um dos tipos de glóbulos brancos com contagem elevada e por isso fala-se em neutrofilia, eosinofilia, basofilia, monocitose ou linfocitose. Num caso de leucopenia, o mais frequente é falar-se em diminuição de neutrófilos – neutrofilia – ou linfócitos – linfopenia- uma vez que são os tipos de leucócitos que estão presentes em maior quantidade no sangue. As alterações no número de leucócitos podem ter causas benignas ou malignas-Tabela 4.

ALTERAÇÃO	CAUSA ASSOCIADA
Neutrofilia	Infeções bacterianas; Dano tecidual; Inflamação; Leucemias; Síndromes mieloproliferativas; Doenças metabólicas; Medicamentos.
Eosinofilia	Doenças alérgicas; Infeções parasitárias; Doenças cutâneas.
Basofilia	Distúrbios leucémicos e mieloproliferativos; Basofilia reacional.
Monocitose	Infeção crónica; Condições inflamatórias crónicas.
Linfocitose	Infeções virais; Linfocitose transitória.
Neutropenia	Produção inadequada pela medula; Retenção no baço.
Linfopenia	Stress; Trauma; Queimaduras; Insuficiência renal; SIDA.

Tabela 4: Alterações no número de leucócitos e possíveis causas associadas.

2.3.3. Patologias associadas à morfologia

Há diversas patologias que podem ser despistadas pela observação das alterações de morfologia que provocam nas três linhagens de células sanguíneas.

Mielofibrose

A mielofibrose é uma neoplasia hematológica de origem clonal em que há uma alteração na célula progenitora pluripotencial hematopoiética, é caracterizada por hematopoiese extramedular, fibrose da medula óssea e esplenomegalia.

Num hemograma esta patologia pode-se refletir numa anemia, com ligeira leucocitose e trombocitose. Pode também haver um aumento de LDH.

Tipicamente, ao microscópio observa-se um esfregaço leucoeritoblástico, com presença de dacriócitos e pontuado basófilo grosseiro nos eritrócitos.

Devido à fibrose da medula, nestes doentes não é feita a colheita para medulograma.^[5,9]

Mieloma múltiplo

Doença neoplásica caracterizada pela acumulação de plasmócitos na medula óssea, que derivam da proliferação de um único clone, e pela produção de uma imunoglobulina

monoclonal que é detetada no soro e/ou urina. Além destas características, para se diagnosticar um mieloma múltiplo sintomático tem que existir lesão orgânica segundo o critério CRAB – hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões osteolíticas. Caso não se verifique lesão orgânica então só se classifica a doença como Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS).

O Mieloma Múltiplo tem etiologia desconhecida, mas há alterações citogenéticas recorrentes tais como translocações – t(4;14), t(11;14); ou deleções – 13q14 ou 17p13 – de cromossomas.^[7]

No laboratório de hematologia o que se pode estudar para ajudar no diagnóstico de Mieloma Múltiplo é: o hemograma no qual surge geralmente uma anemia normocrômica e normocítica, o esfregaço de sangue periférico onde na maior parte dos casos se observa um rouleaux marcado e eventualmente alguns plasmócitos, e por último a velocidade de sedimentação, que nesta condição costuma estar muito elevada.

Estes achados devem ser complementados com análise de medulograma e imunofenotipagem da medula óssea (citometria de fluxo). É também importante neste diagnóstico o laboratório de imunologia, na realização de um proteinograma para deteção de imunoglobulinas monoclonais e caracterização do componente monoclonal por imunofixação.^[5]

Síndrome Mielodisplásico

Grupo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética devido a falha da medula óssea em conjunto com anomalias quantitativas e qualitativas de células sanguíneas no sangue periférico. Caracteriza-se por displasia, citopenias periféricas e hematopoiese ineficaz.

No esfregaço de sangue periférico é frequente observar-se anisopoiquilocitose e pontuado basófilo na linhagem vermelha. Os neutrófilos apresentam-se geralmente hipogranulares e hiposegmentados e podem também observar-se plaquetas gigantes e pontes intercitoplasmáticas. A medula, na maior parte dos casos é hiper celular, com presença de sideroblastos em anel, precursores granulocíticos com deficiente granulação e megacariócitos com núcleos anormais.^[5,7]

Quando se observa um esfregaço de sangue periférico deste tipo deve-se sugerir a realização de um medulograma e imunofenotipagem de medula óssea, para avaliar as diferentes linhagens de células sanguíneas.

Síndrome Linfoproliferativo

Patologias em que há um aumento do número de linfócitos. No esfregaço de sangue periférico observa-se linfocitose, no entanto nem todas as linfocitoses indicam a existência de síndromes linfoproliferativas, é por isso importante analisar a morfologia destes linfócitos e ter um contexto clínico. Caso os linfócitos apresentem pleiomorfismo, então é provável que se esteja perante uma linfocitose reacional devido a infeção viral. Caso a morfologia seja semelhante, assim poder-se-á tratar de uma condição maligna. Neste último caso, o laboratório de hematologia deve sugerir ao clínico a realização de uma imunofenotipagem de sangue periférico do doente com estas alterações, de modo a caracterizar as populações de linfócitos de interesse e as suas proporções através da técnica de citometria de fluxo. Assim, é possível saber qual o tipo de linfócito que está a proliferar (B, T ou NK). No laboratório do CHL o estudo destas síndromes não é mais aprofundado, sendo depois os doentes encaminhados para hospitais com este tipo de cuidados.

3. CITOMETRIA DE FLUXO

O *Facs Calibur* faz uma análise qualitativa e quantitativa de uma suspensão de células da amostra que queremos estudar. Para isto são usados anticorpos ligados a um fluorocromo, que quando se ligam ao respetivo antigénio emitem fluorescência num dado comprimento de onda quando irradiados com um laser. Estes anticorpos são escolhidos de acordo com as populações de células que pretendemos identificar, sendo depois incubados com a suspensão da amostra que estamos a estudar.

Para as imunofenotipagens de sangue periférico feitas no laboratório de hematologia é usado um protocolo para análise dos glóbulos brancos. Este inclui a utilização de uma solução de lise dos eritrócitos para diminuir as interferências causadas por estes e a adição de anticorpos monoclonais – CD45 para identificar leucócitos; CD3, CD8 e CD4 para linfócitos T; CD19 para linfócitos B; CD56 para NK e anticorpos contra cadeias leves kappa e lambda. A análise com estes anticorpos permite determinar a proporção de cada tipo de linfócitos e assim verificar se estamos realmente perante um síndrome linfoproliferativo.

4. HEMOGLOBINA

Os eritrócitos têm como principal função o transporte de oxigênio para as células e o retorno de dióxido de carbono aos pulmões. Para tal são constituídos por moléculas de hemoglobina (Hb), uma proteína globular formada por um grupo heme e quatro subunidades de globina – em que duas são alfa e as restantes duas beta, gama (γ) ou delta (δ). Nos adultos o tipo de hemoglobina predominante é a Hb A ($\alpha_2\beta_2$), havendo apenas pequenas quantidades de Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$). A hemoglobina F (fetal) é a que predomina no feto, mas que diminui rapidamente meses após o nascimento. A quantificação da hemoglobina A₂ é importante para despistar β -talassémias pois é o tipo de hemoglobina predominante uma vez que nesta patologia há uma redução da produção de β -globinas.^[7,8,9]

O equipamento *Capillarys* consegue detetar o tipo de hemoglobina presente em cada amostra. A separação de hemoglobinas normais (A, F e A₂) e variantes de hemoglobina (S, C, E, D) é feita por electroforese em capilares de sílica. Os diferentes tipos de hemoglobina são depois determinados de acordo com a sua absorvância a 415nm. Com o *Capillarys* é possível determinar anomalias qualitativas – hemoglobinopatias –, e quantitativas tais como β -talassémias. Este equipamento também quantifica a hemoglobina glicada (HbA_{1c}) pelo mesmo método, permitindo a monitorização do controlo de glucose por doentes diabéticos.^[8]

5. MEDULOGRAMA

Para um medulograma é necessário aspiração da medula óssea, procedimento que é realizado por médicos. A amostra de medula é depois colocada em lâminas para a sua observação. Quando chegam lâminas de medula óssea ao laboratório de hematologia, estas devem ser colocadas em metanol o mais rápido possível para que não fique comprometida a análise das mesmas. As lâminas são depois coradas. As lâminas com mais fragmentos são sujeitas à coloração de Perls, que permite identificar os depósitos de ferro, e para a análise das diferentes linhagens de células é feita a coloração de May-Grunwald-Giemsa (MGG) no colorador automático. Ao observar estas lâminas ao microscópio é importante ver a riqueza celular, identificar as três linhagens de células sanguíneas, e relatar a (in)existência de megacariócitos e se estes têm uma morfologia normal - com lóbulos sempre pares - ou alterada. É necessário fazer por duas vezes a contagem manual e identificação de duzentas células.

Uma medula pode ser caracterizada como hiper celular, normocelular ou hipocelular, de acordo com a riqueza celular. No entanto, esta classificação é feita tendo em conta a idade do doente, uma vez que com o avançar da idade a riqueza celular vai diminuindo, algo que é natural, não devendo ser classificado como patológico. Com o avançar da idade verifica-se também que há uma maior acumulação de células de gordura (adipócitos) na medula.

6. LÍQUIDOS E LAVADOS BRONCOALVEOLARES

Amostras como líquidos sinoviais, pleurais, ascíticos, cefalorraquidianos e lavados broncoalveolares são também processadas no laboratório de hematologia.

Os líquidos são processados de igual forma. Em primeiro lugar são analisados no equipamento *DxH800*, e caso tenham mais que 150 células por milímetro cúbico então é feita uma contagem manual. Esta contagem diferencial das células nucleadas como polimorfonucleares, mononucleares e outras células (macrófagos, células mesoteliais, células epiteliais, etc.) é feita numa câmara de contagem.

É importante notar que quando se analisa um LCR, este deve ser preparado numa câmara de fluxo laminar de modo a evitar a contaminação do operador. Num LCR de um indivíduo saudável este só deverá conter até 20 eritrócitos, que aparecem devido à punção para obter a amostra, e até 5 leucócitos por milímetro cúbico. A observação de leucócitos polimorfonucleares indica que o doente terá uma infeção bacteriana, e a presença de leucócitos monomorfonucleares indica que o doente terá uma infeção viral.

Após a contagem de células é usada a seguinte fórmula:

$$\text{Total de células nucleadas/mm}^3 = \frac{\text{número de células nucleadas} \times 16 \text{ (microlitros de amostra)}}{3,2}$$

Os lavados não são analisados no equipamento *DxH800* uma vez que contêm poucas células. É então necessário prepará-los de acordo com um protocolo que envolve filtrações e centrifugações, que permitem concentrar as células que possam existir no LBA de modo a ter uma boa amostra para análise. São depois incubados com anticorpos monoclonais fluorescentes (anticorpo linfoclonal, CD19, CD5 e CD45) para a devida análise no citómetro *Facs Calibur*. Esta análise por citometria de fluxo permite despistar a doença do interstício pulmonar.

Também é feita uma lâmina para contagem e observação ao microscópio. O normal é que 80 a 95% das células sejam macrófagos, cerca de 2% linfócitos e 1% de neutrófilos. Podem também aparecer outras células tais como células epiteliais do pulmão.

IV. IMUNOLOGIA

I. SEROLOGIA INFECIOSA

A serologia infecciosa baseia-se na pesquisa de anticorpos presentes no soro, os quais se formam como resposta do sistema imunológico a agentes infecciosos - bactérias, vírus ou protozoários. Na maioria das pesquisas quantifica-se a Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina G (IgG), uma vez que estas imunoglobulinas permitem distinguir infecções agudas de infecções passadas.

Quando se está perante um caso de infecção, verifica-se que os anticorpos IgM são os primeiros a ser produzidos como resposta primária a um antígeno, mas que após um dado tempo (variável de acordo com o tipo de microrganismo) o seu título acaba por diminuir até níveis indetectáveis. Mais tardiamente são produzidos anticorpos IgG que são produzidos em maior quantidade em relação aos anticorpos IgM e que se mantêm detetáveis ao longo de toda a vida, na maioria das infecções. De um modo geral devem-se interpretar os resultados de IgG e IgM da seguinte forma: IgM e IgG negativos – ausência de infecção e de imunidade; IgM e IgG positivos – infecção recente; apenas IgM positivo – infecção aguda; apenas IgG positivo – infecção passada.

No laboratório de imunologia esta pesquisa faz-se com recurso a três técnicas: quimioluminescência no equipamento *Liaison*, ELISA no equipamento *Triturus* e por imunofluorescência indireta no microscópio de fluorescência.

I.1.Liaison

O equipamento *Liaison* usa uma fase sólida de micropartículas paramagnéticas revestidas com um determinado antígeno. Quando o soro entra em contacto com estas partículas, dá-se uma reação antígeno-anticorpo caso estejam presentes anticorpos específicos para os antígenos presentes nas micropartículas. A esta reação é adicionado também um conjugado (anticorpo marcado com uma enzima). O que não se liga às micropartículas paramagnéticas acaba por ser rejeitado por lavagem, mantendo-se as micropartículas na reação devido a uma separação magnética. É adicionado depois um substrato que é degradado pela enzima, e é emitida fluorescência que é lida por um sensor e traduzida num valor de acordo com a sua intensidade.

Neste equipamento faz-se quantificação de anticorpos para:

Vírus Epstein-Barr (EBV): vírus que pertence à família dos herpes vírus e é o agente da mononucleose infecciosa.

- Anticorpos IgM dirigidos para VCA (*antígeno da cápside viral*) – surgem cedo na infeção e desaparecem ao fim de 4/6 semanas;
- Anticorpos IgG dirigidos para VCA – têm um pico às 2/4 semanas, depois declinam ligeiramente e persistem ao longo da vida;
- Anticorpos IgG dirigidos para EBNA (*EBV Nuclear Antigen*) – não aparecem na fase aguda, mas vão surgindo lentamente 2 a 4 meses após o início dos sintomas e persistem ao longo da vida.

Indivíduos que não tenham anticorpos anti-VCA nunca estiveram em contacto com EBV. Quando apenas estão presentes no soro anticorpos IgM anti-VCA ou em conjunto com IgG anti-VCA considera-se que está a ocorrer uma infeção primária, enquanto a presença de anticorpos anti-VCA e anti-EBNA indicam que houve uma infeção passada.^[10]

Citomegalovírus (CMV): é um vírus comum que afeta pessoas de todas as idades. A maioria das pessoas não apresenta sintomas quando infetados.

- Anticorpos IgG e IgM dirigidos para CMV;
- Avidéz dos anticorpos IgG – indica a maturidade dos anticorpos. Estes detetam com maior fiabilidade uma infeção primária uma vez que no início de uma infeção primária são detetados anticorpos de baixa avidéz e apenas 2 a 4 meses após a infeção é que são detetados anticorpos com alta avidéz.^[11]

Como pode ser transmitido da mãe para o feto é importante distinguir uma infeção aguda de uma infeção passada em grávidas. A determinação da avidéz ajuda definir se a infeção decorreu durante a gravidez.

Rubéola: doença contagiosa causada por um vírus da família *Togaviridae*, quando adquirida por grávidas pode trazer complicações para a saúde do feto.

- Anticorpos IgG e IgM.

Toxoplasmose: infeção causada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, tem especial interesse em grávidas uma vez que este parasita consegue ultrapassar a barreira da placenta e comprometer a saúde do feto. É por isso importante saber com alguma exatidão a altura em

que ocorreu a infecção.

- Anticorpos IgG e IgM;
- Avidéz dos anticorpos IgG – permite saber com maior precisão quando ocorreu a infecção. A detecção de anticorpos de alta avidéz exclui a hipótese de a infecção ter ocorrido nos 4 meses anteriores.

Vírus Herpes simplex 1 e 2 (HSV): é importante identificar este agente infeccioso em grávidas pois pode haver a transmissão do vírus na altura do parto, o que pode ter consequências graves para a saúde do recém-nascido.

- Anticorpos IgG e IgM.

Treponema pallidum: é uma bactéria espiroqueta de gram negativo e é o agente responsável pela sífilis, uma doença sistémica transmitida por via sexual. Esta infecção também pode ser transmitida das grávidas para o feto durante a gestação (sífilis congénita).

- Anticorpos IgG e IgM.

O laboratório segue o algoritmo reverso para diagnóstico de sífilis, que passa por fazer um teste treponémico, seguido, caso necessário, de um teste não treponémico e de um segundo teste treponémico confirmatório.

O *screening* inicial de sífilis é feito por um teste treponémico, uma vez que faz a detecção de anticorpos para *Treponema pallidum* por quimioluminescência. Caso seja negativo a pesquisa termina, mas caso seja positivo faz-se um teste não treponémico – RPR, e um teste treponémico confirmatório - TPHA. RPR é um teste de aglutinação que deteta a presença anticorpos para reaginas, substâncias libertadas pelas células como consequência da actividade de *Treponema pallidum*. Estão geralmente presentes na infecção não tratada e por isso este teste é utilizado sobretudo para avaliação da resposta terapêutica. TPHA é também um teste de aglutinação mas que deteta a presença de anticorpos para *Treponema pallidum*, sendo por isso um teste treponémico utilizado como confirmatório.

Para despistar neurosífilis, começa-se também pelo teste serológico, caso este seja positivo faz-se de seguida o teste RPR na amostra de LCR e por último um teste treponémico confirmatório no líquido por IFI - FTA-ABS.

1.2. Triturus

O equipamento *Triturus* utiliza a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) num ensaio do tipo *sandwich*. Neste ensaio, há uma matriz sólida revestida de antígenos do microrganismo para o qual se pretende pesquisar anticorpos, à qual se adicionam as amostras de soro. Caso existam anticorpos específicos, estes vão formar imunocomplexos o que permite que depois se faça uma lavagem para rejeitar todos os anticorpos que não se ligaram à matriz. Numa segunda fase são adicionados anticorpos anti IgG e IgM marcados com uma enzima. Esta vai degradar um substrato dando origem a um produto com cor, que pode ser medido e traduzido num valor de concentração de acordo com a sua intensidade. No equipamento *Triturus* são doseados anticorpos IgG e IgM para os seguintes microrganismos:

- *Chlamydia pneumoniae*: bactéria intracelular obrigatória de gram negativo responsável por pneumonias e bronquites.
- *Mycoplasma pneumoniae*: bactéria intracelular obrigatória responsável por infeções respiratórias, mais comumente causa traqueobronquite em crianças e adolescentes, podendo também causar pneumonia nos restantes grupos etários.
- *Legionella pneumophila*: bactéria de gram negativo responsável por um tipo de pneumonia também chamado de doença dos legionários.
- *Borrelia burgdorferi*: bactéria espiroqueta responsável pela doença de Lyme, é transmitida através da picada da carraça *Ixodes scapularis*.
- *Chlamydia trachomatis*: bactéria de gram negativo intracelular obrigatória que é o agente responsável pela clamidiose, uma doença sexualmente transmissível.

1.3. Imunofluorescência Indireta

A imunofluorescência indireta (IFI) é a técnica utilizada no laboratório para determinar a presença de anticorpos contra os agentes infecciosos *Coxiella burnetti*, *Rickettsia conorii* e *Treponema pallidum*. Esta técnica consiste numa reação de antígeno-anticorpo na qual os antígenos do agente infeccioso estão ligados a uma fase sólida em lâminas. Caso a pessoa tenha tido contacto com o agente infeccioso, terá anticorpos IgM e/ou IgG no seu soro que se irão ligar ao antígeno presente nas lâminas. Numa segunda fase são adicionados anticorpos anti imunoglobulinas humanas marcados com fluoresceína com especificidade para IgG e IgM. As lâminas são depois observadas ao microscópio de fluorescência, e caso a amostra seja positiva esta vai apresentar uma fluorescência verde maçã quando irradiada com uma lâmpada LED.

Para pesquisa de anticorpos de *Coxiella burnetti* e *Rickettsia conorii* são utilizados kits da Vircell.

- *Coxiella burnetti* é a bactéria responsável pela febre Q, uma doença com estádios agudos e crônicos. Tem reservatórios animais, e causa infecção através da sua inalação, ingestão ou através de vetores como carrças. O sistema imunitário só começa a produzir níveis detetáveis de anticorpos contra *Coxiella burnetti* ao fim de cerca de uma semana por isso não se deve excluir o diagnóstico de febre Q antes deste período de tempo.^[12]

As lâminas de *Coxiella* têm dois poços para cada amostra onde estão separadamente anticorpos de fase I e fase II, duas fases antigénicas distintas para as quais se desenvolvem anticorpos. Na fase aguda há um predomínio de resposta ao antigénio de fase II de *Coxiella burnetti* enquanto na fase crónica há um predomínio de resposta aos antigénios de fase I. Estamos perante um resultado positivo quando nalgum poço se observa uma fluorescência verde maçã com morfologia coco-bacilar - Figura 6.a. O passo seguinte é fazer pesquisa de IgM e IgG em diluições da amostra em questão até ser determinado o título destes anticorpos.

- *Rickettsia conorii* é uma bactéria intracelular obrigatória com características de bacilos de gram negativo, e é transmitida pelo artrópode *Rhipicephalus sanguineus*. É responsável pela febre escaro-nodular, uma zoonose que tem uma grande prevalência na região de Leiria. De modo a detetar anticorpos o ideal seria colher duas amostras com 7 a 10 dias de intervalo de modo a detetar a seroconversão ou aumento do título de anticorpos.^[13]

Em lâminas de *Rickettsia conorii* faz-se um *screening* inicial com um *pool* de IgG e IgM em diluições de 1/40 e 1/80 para cada amostra de soro. Caso algum poço apresente fluorescência verde maçã também com morfologia coco-bacilar fazem-se mais diluições para determinar o título e tipo de anticorpos presentes na amostra.

- Para o diagnóstico de neurosífilis é necessário o uso de testes não treponémicos e treponémicos. Após a realização de um teste não treponémico, o passo seguinte é realizar um teste confirmatório treponémico por IFI - FTA-ABS.^[14] A pesquisa de *Treponema pallidum* é feita com um kit da Biomérieux. As lâminas têm poços revestidos com antigénios de *Treponema pallidum*, aos quais se adiciona LCR e numa segunda fase os anticorpos anti IgG e IgM. Caso alguma amostra tenha anticorpos contra *Treponema pallidum* ao microscópio observam-se espiroquetas com fluorescência verde maçã- Figura 6.b.

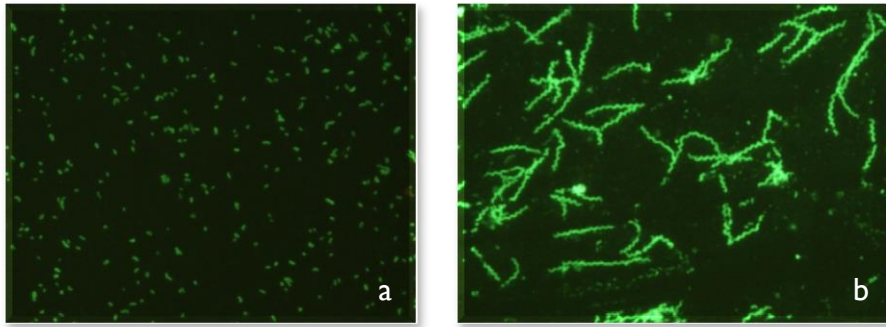


Figura 6: Exemplo de amostras positivas em IFI, apresentando a cor verde maçã. a) Morfologia cocobacilar observada em lâminas de *Coxiella burnetii* e *Rickettsia conorii*. b) Espiroquetas observadas em lâminas de *Treponema pallidum*.

2. ESTUDO DE PROTEÍNAS

O estudo de proteínas é feito com o auxílio do equipamento *Hydrasis*, através da técnica de eletroforese em gel de agarose, a qual permite separar as diferentes proteínas de uma amostra de acordo com o seu tamanho e carga elétrica. Por esta técnica são feitos proteinogramas e imunofixações de soro e de urina. O equipamento também permite fazer a pesquisa de bandas oligoclonais em LCR por focagem isoeletrica.

2.1. Proteinogramas

Os proteinogramas permitem traçar o perfil eletroforético das proteínas existentes no soro. O *Hydrasis* dá uma informação qualitativa e quantitativa por densitometria - Figura 7.b.

São feitos quando há suspeita de produção anormal de proteínas, geralmente para a pesquisa de uma componente monoclonal.

As proteínas ficam separadas em cinco grandes grupos, cada um representado por uma fração no gel: albumina, α 1-globulina, α 2-globulina, β -globulina e gamaglobulina-Figura 7.a/b.

A albumina é uma proteína de transporte e a mais abundante do plasma. Está diminuída em situações de hepatopatias e nefropatias e elevada em casos de desidratação.

A fração α 1-globulina é formada pelas proteínas α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína, transcortina, α -lipoproteína e α -fetoproteína. A α 1-antitripsina é uma proteína de fase aguda, o que faz com que haja um aumento desta fração em caso de processos inflamatórios agudos. Em caso de diminuição indica por norma uma deficiente produção de α 1-antitripsina.

A fração da α_2 -globulina tem como principais proteínas integrantes a α_2 -macroglobulina, a haptoglobina e a ceruloplasmina. Estas são também proteínas de fase aguda.

A fração das β -globulinas tem como principais proteínas a transferrina, a hemopexina, a betalipoproteína e complemento 3. Nesta fração pode também aparecer uma correspondência com uma gamapatia monoclonal, nomeadamente IgA.

A fração das gamaglobulinas é constituída pelas principais imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, e dá-nos informação da concentração destas proteínas, em especial de IgG. O aumento desta fração pode ser policlonal como acontece por exemplo em caso de infeções, hepatopatias ou doenças autoimunes, ou monoclonal quando aparece um pico de base estreita correspondente à produção de um único tipo de cadeia de imunoglobulinas. Este pico de produção monoclonal deve-se sobretudo a gamapatias monoclonais.

Quando na eletroforese de proteínas aparece uma banda monoclonal deve-se em seguida fazer uma imunofixação sérica de modo a identificar a imunoglobulina que está a ter uma produção patológica - Figura 7.c.^[15]

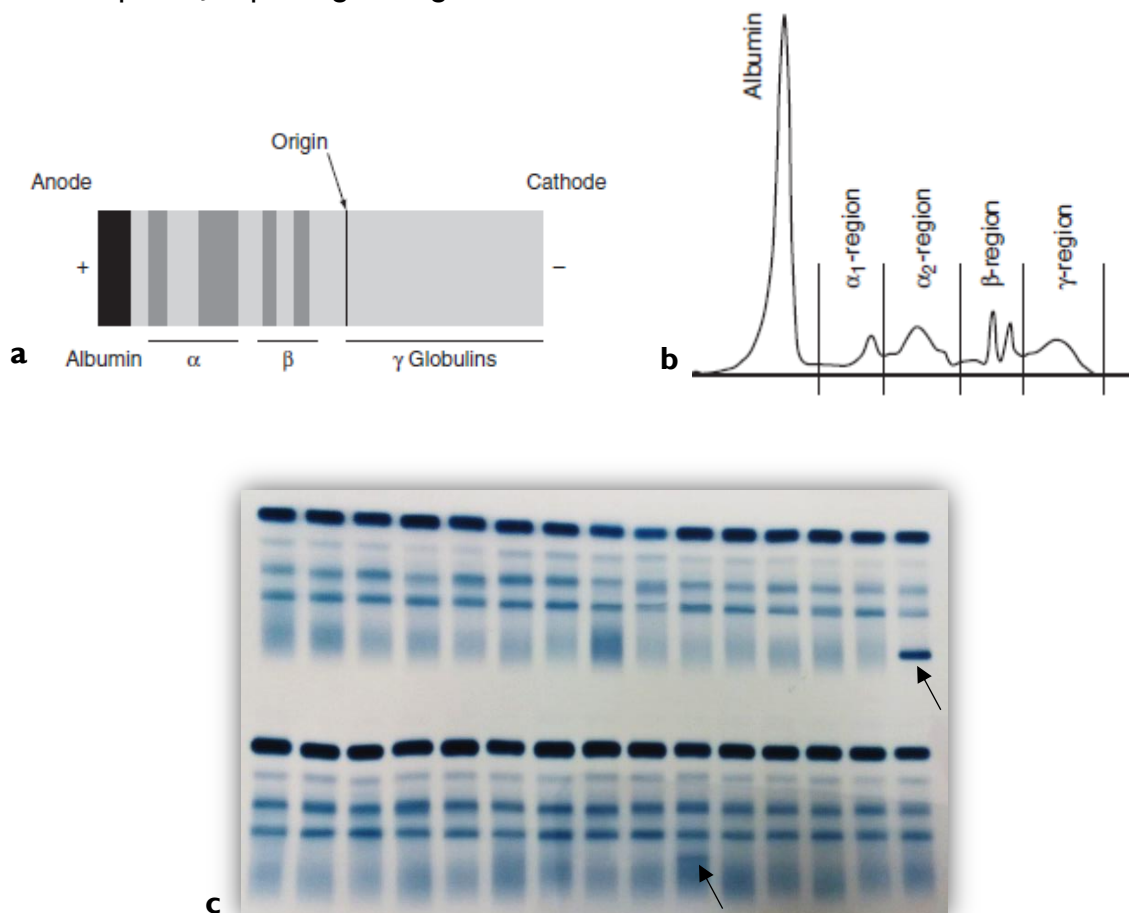


Figura 7: Proteinograma. a) Esquema de migração normal das proteínas b) Esquema da leitura e quantificação de proteínas de uma amostra normal c) Exemplo de proteinograma com amostras de 30 doentes, as setas indicam bandas na região gama logo estas amostras requerem um posterior estudo por imunofixação. Esquemas adaptados de Keren D., Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis (2003).

2.2. Imunofixação

Uma imunofixação sérica consiste numa eletroforese de proteínas em gel de agarose seguida de uma precipitação de cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas com anti-soros, de modo a poder caracterizar a gamapatia monoclonal que possa existir. Inicialmente aplicam-se anti-soros dirigidos para as cadeias pesadas IgG, IgA, IgM e cadeias livres kappa e lambda, uma vez que estão mais frequentemente envolvidos na patologia. As gamopatias monoclonais de cadeias pesadas IgD e IgE, são muito mais raras, e por isso só se faz a pesquisa destas cadeias caso no gel apareçam bandas nas cadeias leves sem correspondência nas cadeias pesadas IgG, IgA ou IgM - Figura 8.

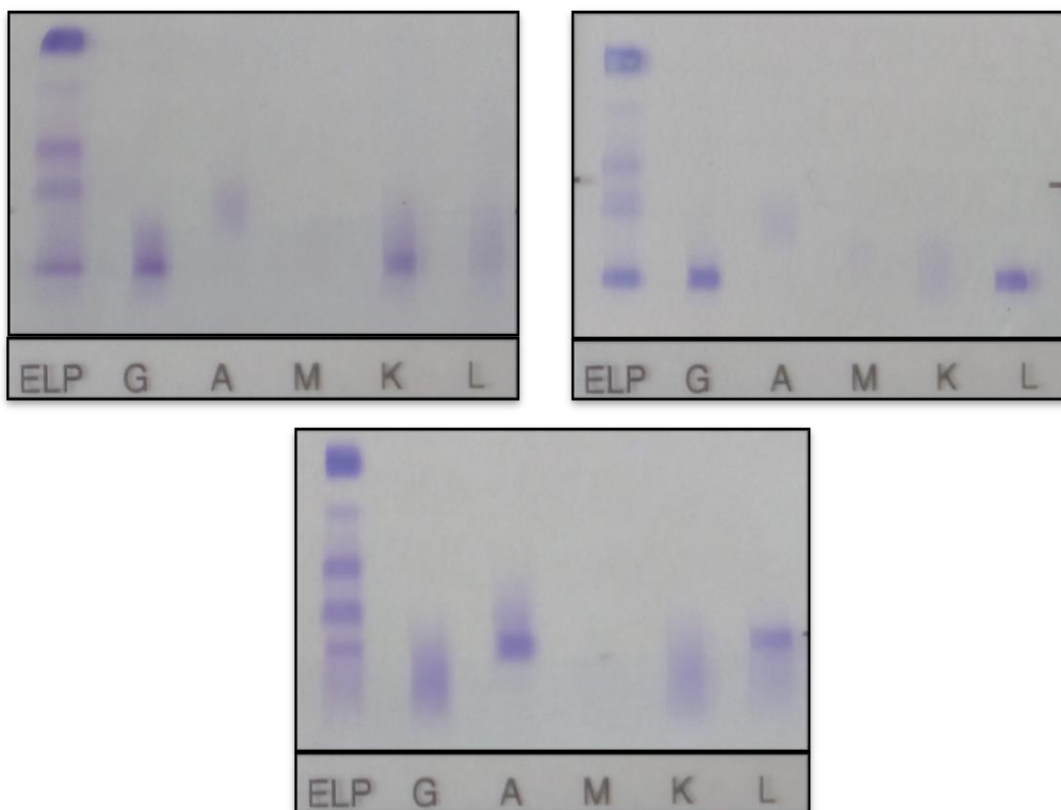


Figura 8: Imunofixações séricas em gel de agarose, com exemplos de resultados patológicos. a) Perfil IgG kappa b) Perfil IgG lambda c) Perfil IgA lambda.

As imunofixações de urina, normalmente são pedidas para a pesquisa de proteína Bence Jones. Deste modo, são aplicados anti-soros específicos dirigidos para as cadeias pesadas IgG, IgA e IgM e anti-soros dirigidos para as cadeias livres e cadeias leves livres kappa e lambda.

As imunofixações de urina permitem despistar também a existência de lesões renais e a sua gravidade. Quando se verifica a presença de proteínas do soro na urina é porque há comprometimento renal, estando afetada a normal permeabilidade do glomérulo. Numa situação destas a primeira molécula a aparecer na urina é a albumina uma vez que o seu tamanho está no limite de permeabilidade do glomérulo. Em casos mais graves começam a aparecer moléculas maiores tais como as imunoglobulinas.

A presença da proteína de Bence Jones na urina é sugestivo, por exemplo, de mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström, doença de cadeias leves ou amiloidose.

2.3. Pesquisa de bandas oligoclonais

A pesquisa de bandas oligoclonais é feita pela técnica de focagem isoeletrica seguida de precipitação com anti-soros dirigidos para IgG. No gel migram lado a lado LCR e soro do mesmo doente para se poder comparar a presença de IgG.

O aparecimento de bandas oligoclonais pode ocorrer devido a um comprometimento da barreira hematoencefálica (aumento da permeabilidade), e neste caso há uma correspondência com as proteínas que aparecem no soro. A produção de bandas apenas no LCR indica que existe produção local (síntese intratecal) de imunoglobulinas.

Os resultados são depois avaliados usando o diagrama de Reiber - Figura 9.a. Com os valores dos índices de IgG e de albumina, que são obtidos através do doseamento destas proteínas no equipamento *Image*, e ao cruzar estes dois valores no diagrama chega-se a um ponto que fica numa de 5 áreas possíveis e que indicam:

- 1) área de referência;
- 2) barreira hematoencefálica comprometida sem síntese local de IgG;
- 3) barreira hematoencefálica comprometida com sínteses adicional de IgG;
- 4) síntese de IgG com barreira hematoencefálica intacta;
- 5) sem interpretação científica.

Este estudo fornece informação útil para o diagnóstico de esclerose múltipla uma vez que há uma boa correlação entre esta condição e a produção intratecal de IgG. No entanto, a presença de bandas oligoclonais não serve de diagnóstico de esclerose múltipla uma vez que também há produção de IgG noutras doenças inflamatórias. Como este estudo não é específico o suficiente, estes resultados têm que ser apoiados pela clínica e outros exames complementares - Figura 9.b.^[16]

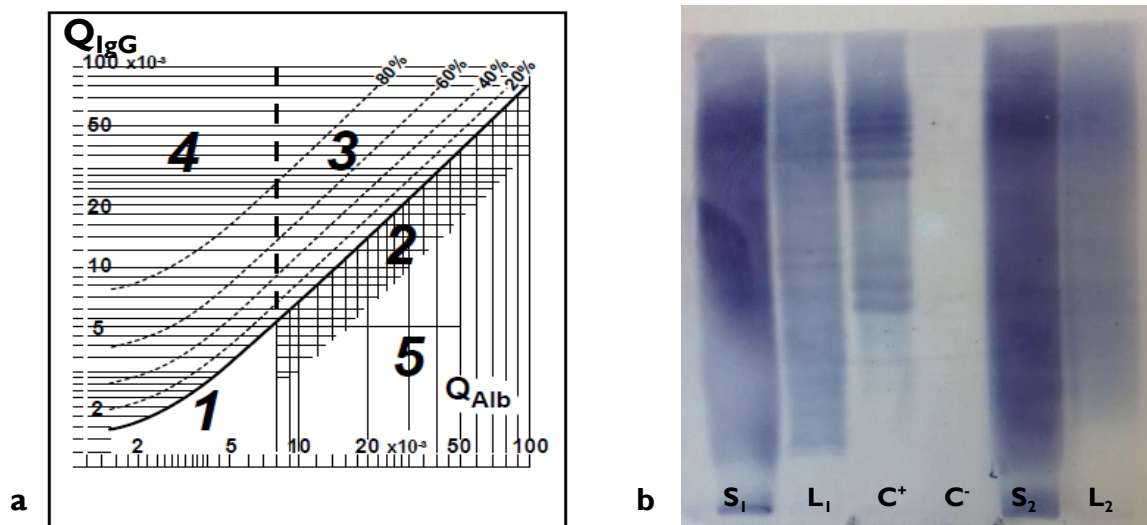


Figura 9: Análise de resultados de pesquisa de bandas oligoclonais. a) Diagrama de Reiber. Permite analisar a integridade da barreira hematoencefálica e a síntese de IgG. b) Exemplo gel resultante de pesquisa de bandas oligoclonais em dois doentes. Verifica-se produção intratecal na amostra 1, sugestivo de Esclerose Múltipla. (S1-Soro 1; L1-LCR 1; C+- controlo positivo; C- controlo negativo; S2 – soro 2; L2 –LCR 2)

3.AUTOIMUNIDADE

Para o estudo de doenças autoimunes são usadas as técnicas de imunofluorescência indireta, FEIA e Imunoblotting. Existem quatro grandes grupos de doenças para os quais se utilizam estas técnicas de modo a complementar o seu diagnóstico. Este estudo baseia-se na pesquisa de autoanticorpos, sendo que a presença de determinados autoanticorpos poderá ser sugestiva de uma patologia autoimune em particular - Tabela 5.

Patologia Autoimune	Autoanticorpos	Perfil
Anemia Perniciosa	<ul style="list-style-type: none"> · FI · PCA 	Gástrico
Encefalite	<ul style="list-style-type: none"> · Hu · CV-2 	Neuronal
AOMP	<ul style="list-style-type: none"> · Ri 	
DPC	<ul style="list-style-type: none"> · Yo 	
Romboencefalite	<ul style="list-style-type: none"> · PNMA-2 	
Síndrome de Pessoa Rígida	<ul style="list-style-type: none"> · Anfifisina 	
Hepatite Autoimune	<ul style="list-style-type: none"> · SLA/LP · LCI · LKM-I 	Hepático
Cirrose Biliar Primária	<ul style="list-style-type: none"> · AMA-M2 · Sp100 · gp120 · PML 	
Lupus Erimatoso Sistémico	<ul style="list-style-type: none"> · PCNA · dsDNA · Nucleossomas · Histonas · Proteína P Ribossomal · SS-B · Ro-52 · SS-A · Sm 	ANA
Síndrome de Sjögren	<ul style="list-style-type: none"> · SS-A · Ro-52 · SS-B 	
Esclerose sistémica	<ul style="list-style-type: none"> · PM-Scl · Scl-70 · CENP-B 	
Poliomiosite	<ul style="list-style-type: none"> · Jo-1 · PL-7 · PL-12 	Citoplasmático

Tabela 5: Perfil de autoanticorpos e patologia autoimune associada.

3.1. Doenças autoimunes sistémicas

Anticorpos Anti-Nucleares (ANA):

Em certas patologias, como doenças do tecido conjuntivo (lúpus erimatoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerose sistémica, polimiosite/dermatomiosite) e doenças reumáticas, há a produção de anticorpos que reagem com constituintes do núcleo ou citoplasma das células do próprio indivíduo – como por exemplo ADN, ARN, proteínas, ribonucleoproteínas e mitocôndrias. Estes autoanticorpos são por isso marcadores que podem dar informação

cl clinicamente útil para complementar diagnóstico de doenças crônicas imunoinflamatórias.^[17]

Inicialmente, estes anticorpos IgG são pesquisados por IFI. Para tal são utilizados kits NOVA Lite da INOVA, que consistem em lâminas com poços com substrato antigénico HEp-2 (linha celular epitelial humana). Estes poços são incubados com as amostras de soro dos doentes para permitir a formação de imunocomplexos entre os anticorpos IgG que possam existir no soro e os antígenios do substrato. Numa segunda fase há uma incubação com um conjugado de IgG anti-humano marcado com fluoresceína, que vai permitir revelar os anticorpos que reagiram com as células HEp-2.

A análise ao microscópio de fluorescência compreende a determinação qualitativa do grau de fluorescência, de 1 a 4, por comparação com os controlos negativo e positivo, e a interpretação do padrão de fluorescência. Existem diversos padrões que podem surgir, sendo os mais comuns: mosqueado, homogéneo, nucleolar, centrómero, dots nucleares e citoplasma fibroreticular - Figura 11. É também importante referir se são observadas mitoses com fluorescência.

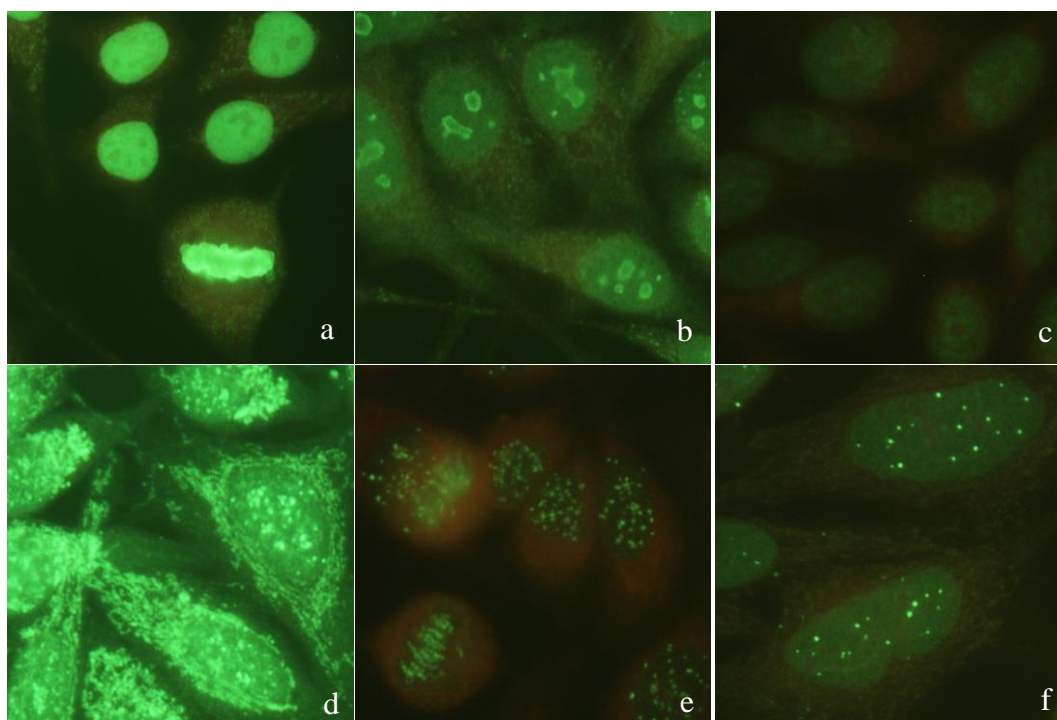


Figura 10: Exemplos de padrões ANA por IFI. a) Homogéneo; b) Nucleolar; c) Mosqueado; d) Fibroreticular; e) Centrómero; f) Dots Nucleares.

É importante perceber que há padrões de fluorescência que são relativamente inespecíficos podendo ser revelados por diversos tipos de autoanticorpos, no entanto existem outros padrões que ocorrem devido a uma gama mais restrita de autoanticorpos e

até há alguns padrões exclusivos de determinados autoanticorpos. Por isto, os resultados positivos não permitem fazer diagnóstico, apenas indicam uma possível relação com determinada patologia. O passo seguinte é fazer testes confirmatórios recorrendo à técnica de Immunoblotting ou FEIA, as quais permitem a identificação dos autoanticorpos.^[18]

Imunoblotting:

O equipamento *Euroblotmaster* permite fazer um ensaio qualitativo e semi-quantitativo de autoanticorpos humanos IgG para determinados perfis de antigénios, em amostras de soro. Isto é feito a partir de tiras teste revestidas com linhas paralelas impregnadas com antigénios purificados. Quando na amostra há anticorpos IgG específicos de algum tipo de antigénios presente na tira, estes formam um complexo. Num passo seguinte há a incubação das tiras com anticorpos anti-IgG humana marcados com uma enzima que vai permitir a revelação do tipo de autoanticorpos presentes pela catalização de uma reação colorimétrica.

Existem vários tipos de perfis para pesquisa dos autoanticorpos mais comuns - Tabela 6. A presença de determinados autoanticorpos poderá sugerir a existência de uma patologia autoimune com alguma especificidade.

Dots Hepáticos	AMA-M2; BPO; Sp100; PML; gp210; LKM-1; LC-1; SLA/LP; Ro-52
Dots Neurais	Hu; Ri; Yo; CV-2; PNMA2; CV2; Anfifisina
Dots ANA	Nrnp-sm; SS-A; Ro-52; SS-B; Scl-70; PM-scl; Jo-1; CENP B; PCNA; DsDNA; Nucleossomas; Histonas; Proteína P Ribossomal; AMA-M2
Dots Gástricos	FI; PCA
Dots Citoplasmáticos	M2/nPDC; Jo-1; PL-7; PL-12; SRP-54; Proteína P Ribossomal

Tabela 6: Perfis de antigénios para os quais se pesquisam autoanticorpos, por Immunoblotting.

FEIA:

A técnica FEIA é utilizada pelo equipamento *Imunocap 250* e consiste num imunoensaio fluoroenzimático em *sandwich*. Neste tipo de ensaio os poços estão cobertos com um antigénio para o qual se pretende pesquisar anticorpos específicos no soro. Estes anticorpos serão marcadores de determinada doença autoimune. Caso estes existam, vai haver uma ligação antigénio-anticorpo à qual, numa segunda etapa, se vai ligar um anticorpo secundário que está conjugado com uma enzima. É depois adicionado um substrato que é transformado num produto com fluorescência por esta enzima. A determinação da concentração de IgG é feita por comparação do sinal de fluorescência emitido no ensaio,

com o de calibradores que têm concentrações conhecidas.

Por esta técnica são feitos testes confirmatórios de ANA – Sm, RNP, SSA, SSB, centrómero B, dsDNA, Jo1 e Scl70.

É também feita a detecção de anticorpos anti-CCP (Peptídeo C Citrulinado). Este é o marcador mais específico associado ao diagnóstico de artrite reumatóide.^[19]

3.2.Vasculites autoimunes

Autoanticorpos antineutrófilos citoplasmáticos (ANCA):

Estes anticorpos são marcadores sensíveis para o diagnóstico e tratamento de granulomatose de Wegener e outras vasculites sistêmicas.

Através da incubação das amostras com um substrato de neutrófilos é possível, por imunofluorescência indireta, detetar estes anticorpos com recurso a *kits* ANCA NOVA Lite da INOVA.

Os ANCA reagem com enzimas existentes nos grânulos existentes no citoplasma dos neutrófilos, tais como: proteinase 3 (PR3), mieloperoxidase (MPO), elastase, e catepsina G.

Existem dois tipos principais de padrões de fluorescência: c-ANCA (fluorescência citoplasmática) e p-ANCA (fluorescência perinuclear).

Anticorpos com afinidade para PR3 estão relacionados com a granulomatose de Wegener e produzem um padrão c-ANCA. Anticorpos com afinidade para MPO aparecem principalmente em doentes com poliangite microscópica, Síndrome de Churg-Strauss e doença inflamatória intestinal e produzem um padrão de fluorescência p-ANCA. Estes padrões são observados em lâminas com neutrófilos fixados em etanol - Figura 11.^[20]

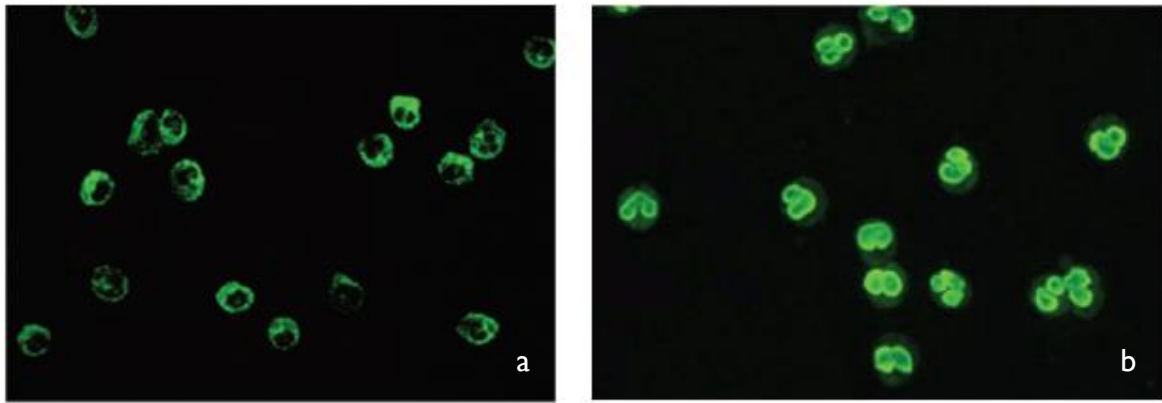


Figura 11: Padrões de fluorescência ANCA. a) Padrão c-ANCA. b) Padrão p-ANCA. Adaptado de Schulte-Pelkum J., Radice A., Norman GL, et al., *Novel Clinical and Diagnostic Aspects of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies*, *Journal of Immunology Research* (2014).

É importante distinguir os verdadeiros padrões c-ANCA e p-ANCA de artefactos e de padrões ANCA atípicos. Isto é possível através da comparação de lâminas com neutrófilos fixados em etanol e em formol. Quando os neutrófilos são fixados em etanol os grânulos citoplasmáticos migram para o ADN do núcleo resultando num padrão p-ANCA. Se forem fixados em formol não ocorre esta migração, pelo que amostras verdadeiramente p-ANCA vão ter um padrão c-ANCA nestas lâminas. Amostras ANA positivas ou ANCA atípicas quando testadas em lâminas de formol tornam-se negativas. A positividade para ANA pode ser confirmada em lâminas Hep-2.

Anticorpos anti-membrana basal glomerular:

Resultados ANCA positivos podem indicar a presença de anticorpos anti-membrana basal glomerular. A pesquisa destes anticorpos por FEIA é importante, pois a sua presença está associada ao síndrome de Goodpasture, glomerulonefrite rapidamente progressiva e outras vasculites associadas a ANCA.

3.3. Doenças autoimunes hepáticas

Substrato triplo:

Este tipo de lâminas NOVA Lite da INOVA têm em cada poço células de fígado, rim e estômago de rato fixadas. Estas permitem a deteção de anticorpos anti-mitocondriais (AMA), anti-músculo liso (ASMA), anti-microsossomais de fígado e rim (LKM), anti-citosol hepático (LC) e anti-células parietais gástricas (APCA).

Ao usar três tecidos diferentes torna-se mais fácil comparar os resultados obtidos em cada tipo de tecido o que permite identificar autoanticorpos.

AMA marcam o citoplasma dos túbulos distais e proximais do rim, citoplasma de células hepáticas e citoplasma de células parietais do estômago. Estão associados a cirrose biliar primária e outras doenças do fígado.

ASMA marcam camadas musculares do estômago, células mesangiais do glomérulo, fibras a volta de túbulos renais e camadas musculares dos vasos sanguíneos. Estão associados a hepatite autoimune tipo I e cirrose biliar primária.

APCA são detetados no tecido do estômago. Marcam apenas a H⁺/K⁺ATPase presente nas células parietais, por isso todas as outras células do estômago vão-se apresentar como negativas. APCA são encontrados frequentemente no soro de doentes com anemia perniciosa. ^[21]

Anticorpos LKM marcam citocromos do retículo endoplasmático, o que se traduz numa fluorescência no citoplasma de células do fígado e de túbulos proximais no rim. Anticorpos LC também marcam células do fígado. Estes dois tipos de autoanticorpos estão associados a hepatites autoimunes tipo II e Hepatite C. ^[22]

Os ANA também pode ser identificados neste tipo de lâminas ao marcar o núcleo de células de fígado e túbulos renais distal e proximal. Estão muito associados a doenças do tecido conjuntivo, hepatite autoimune e cirrose biliar primária.

3.4. Doenças inflamatórias intestinais

Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*:

A pesquisa de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) por IFI permite em conjunto com os resultados de p-ANCA, orientar o diagnóstico de uma possível doença inflamatória intestinal como colite ulcerosa ou doença de Crohn. Um resultado é positivo quando se observam leveduras globulares com fluorescência.

Se temos resultados ASCA positivos e p-ANCA negativos para uma dada amostra, então é mais provável que o doente tenha doença de Crohn. Caso se verifique o contrário, ASCA negativos e p-ANCA positivos, estamos perante um caso mais sugestivo de colite ulcerosa.

Doença Celíaca:

Esta doença resulta de uma intolerância ao glúten é caracterizada por inflamação crónica da mucosa gastrointestinal, levando à atrofia das vilosidades intestinais e má absorção. O seu estudo é feito por ELISA e por IFI.

Por ELISA faz-se o doseamento de anticorpos anti-gliadina e anti-transglutaminase tecidual. A gliadina é uma proteína constituinte do glúten capaz de despoletar esta doença, enquanto a transglutaminase tecidual é uma enzima que está envolvida na formação de matriz extracelular e mecanismos de reparação de tecidos e que consegue usar a gliadina como substrato.

Por imunofluorescência são observadas lâminas com secções de esófago que podem ser usadas para a deteção de anticorpos anti-endomísio (IgA). Quando estão presentes, estes anticorpos vão fazer com que seja possível visualizar com fluorescência fibras "semelhantes a reticulina" no tecido conjuntivo à volta das fibras musculares lisas. Esta fluorescência é observada após adicionar anticorpos anti-IgA marcados com FITC. Estes anticorpos são bastante sensíveis e específicos para a identificação desta doença uma vez que estão presentes no soro da maioria destes doentes.

O estudo da doença celíaca inicia-se com a determinação de anticorpos anti-transglutaminase tecidual IgA. Apenas as amostras positivas são avaliadas para a presença de anticorpos anti-endomísio (IgA). A determinação de anticorpos anti-gliadinas é reservada para crianças uma vez que a seroconversão da transglutaminase, por norma, só ocorre apenas após os cinco anos de idade. Em doentes com deficiência de IgA devem ser determinados os anticorpos anti-transglutaminase tecidual IgG.

Estes marcadores serológicos são bastante específicos e sensíveis sendo um bom complemento para o diagnóstico de doença celíaca. Com uma dieta isenta de glúten é possível reverter os sintomas e curar a lesão intestinal. É possível monitorizar os doentes recorrendo a estes anticorpos, uma vez que ao fim de alguns meses com esta dieta os títulos de anticorpos acabam por normalizar. ^[23,24]

3.5. Estudo de anemias

Imunoblotting:

Os dots gástricos incluem a pesquisa de autoanticorpos para o fator intrínseco (IF), e autoanticorpos dirigidos para as células parietais do estômago (APCA).

Estes permitem avaliar doentes com possível anemia perniciosa. A anemia perniciosa ocorre devido a uma deficiência na absorção de vitamina B12. Esta absorção pode estar comprometida devido à falta da molécula que permite a sua absorção, ou seja, do fator intrínseco, ou devido à destruição das células parietais, as quais são responsáveis pela produção de fator intrínseco.

4. ALERGIAS

O despiste de alergias é feito no equipamento *Imunocap 250*. Os testes são feitos por meio de um imunoensaio fluoroenzimático em sandwich (FEIA).

Nesta técnica há uma mistura de alergénios ligados a uma fase sólida aos quais se vão ligar os anticorpos IgE específicos presentes na amostra de soro do doente. Após lavagem é adicionado um segundo anticorpo anti-IgE marcado com uma enzima que vai reagir com um substrato que vai emitir fluorescência. A fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de IgE na amostra.

Neste equipamento faz-se o teste Phadiatop, o qual indica o grau de sensibilização para um painel de alergénios inalantes (caspa de gato, caspa de cão, ácaros, gramíneas, árvores, ervas daninhas e fungos) e o teste multi-rastreio alimentar (Fx5), o qual indica o grau de sensibilização para alergénios alimentares mais comuns (clara de ovo, leite, peixe, trigo, amendoim e soja).

Se houver alguma amostra positiva para a mistura de alergénios, o equipamento abre o painel pré-definido e volta a testar a amostra, para cada um dos alergénios em separado. Para além destes, as amostras podem ser testadas para alergénios que não estão incluídos no Phadiatop e no multi-rastreio alimentar. Será a história clínica que irá direcionar o estudo para a pesquisa de IgE específicas.

V. BIOQUÍMICA

No laboratório de bioquímica são processadas amostras de sangue total, soro, plasma e urina. Aqui faz-se o doseamento de diversos parâmetros para avaliação de função tiroideia, renal, hepática, cardíaca, pancreática, metabolismo de lípidos, equilíbrio eletrolítico, abuso de drogas, terapêutica farmacológica, marcadores tumorais e urina tipo II.

A maioria das amostras que chega ao SPC vão para o laboratório de bioquímica, onde são colocadas em primeiro lugar no equipamento *Automate* que faz os processos de triagem e aliquotagem, separando os tubos de amostras pelo equipamento onde têm que ser colocados de acordo com as análises que estão pedidas.

Cada vez mais é importante fazer um acompanhamento personalizado do doente. É de notar que mesmo que um doente apresente valores analíticos dentro dos valores considerados normais, isto não significa que sejam valores ótimos para aquele doente devido à existência de variabilidade biológica. Existe variabilidade biológica intra e interindividual, o que significa que os intervalos de referência normais podem não ser os mais indicados como referência para determinado indivíduo ou população. Ter noção desta variabilidade é importante porque permite otimizar o tratamento e terapêutica de cada doente. Estudar a variabilidade biológica dos doentes também é útil no controlo de qualidade do laboratório uma vez que a dispersão das magnitudes biológicas permite verificar se os equipamentos estão a funcionar corretamente. Por norma existe um equilíbrio biológico entre os valores de cada doente e para determinado doseamento, ao longo do tempo - Figura 12. Quando se verifica um desequilíbrio é porque a estabilidade do método de doseamento se encontra comprometida.

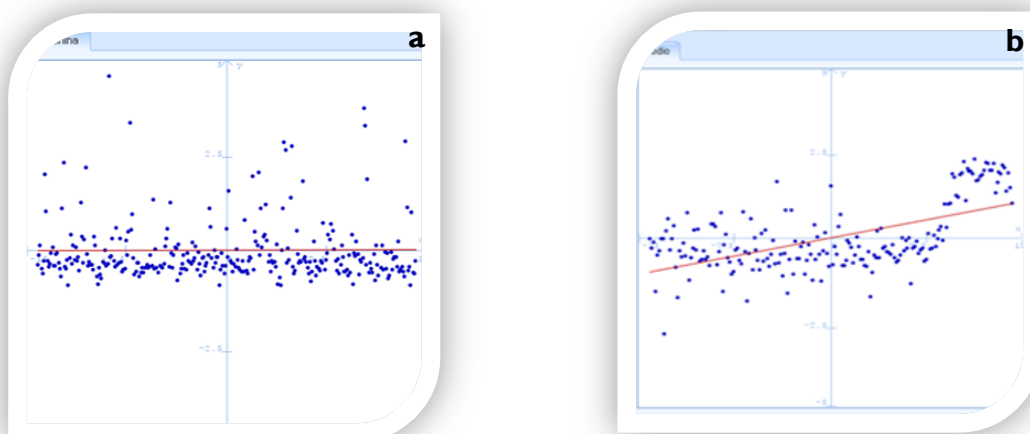


Figura 12: Dispersão das magnitudes biológicas. a) Equilíbrio Biológico; b) Desequilíbrio pode indicar instabilidade no método de doseamento do parâmetro.

VI. MICROBIOLOGIA

Ao laboratório de Microbiologia chegam os mais diversos produtos biológicos: urina, sangue, LCR, lavados broncoalveolares, líquido ascítico, sinovial, expetoração, fezes, etc. Principalmente são amostras que chegam para cultura bacteriológica, e por isso são o mais rápido possível semeadas nos meios de gelose de chocolate com bacitracina e em gelose de sangue, com a exceção de amostras de urina que são diretamente semeadas em Uricults (meios MacConkey, CLED e *Enterococcus sp.*) no momento da colheita.

A análise das culturas em complemento com a observação do Gram tem que ser bastante cuidadosa de modo a identificar o possível agente que está a infetar cada doente. Para isto é muito importante em primeiro lugar conhecer a flora normal de cada amostra de maneira a saber quais os microrganismos que devem ser valorizados e reportados ao clínico, e os que não têm qualquer valor significativo para a condição do doente. É preciso também ter em conta que no hospital se encontram doentes imunocomprometidos que podem ter infeções por microrganismos oportunistas. É importante fazer rastreios a estes doentes de modo a evitar e/ou controlar IACS.

As características morfológicas e bioquímicas que as colónias apresentam permitem direcionar a identificação do microrganismo e respetivo antibiograma no equipamento Vitek 2.

A este laboratório chegam garrafas de hemoculturas pediátricas e hemoculturas aeróbias e anaeróbias, que são devidamente incubadas nas condições ideais no equipamento *BactAlert*, o qual analisa se existe crescimento bacteriano. Neste equipamento também são colocadas garrafas para pesquisa de micobactérias, que são preparadas através de um processo que envolve etapas de homogeneização, descontaminação e concentração das amostras às quais são pedido exame micobacteriológico. Este exame envolve também a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes pela coloração de Ziehl-Neelsen.

Neste laboratório também se fazem pesquisa de antígenos de *Clostridium difficile* em fezes, *Legionella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae* em urina e vírus Influenza A e B, por testes imunocromatográficos. Em crianças é feita pesquisa de vírus respiratórios em secreções nasais (Influenza A e B; Parainfluenza 1, 2 e 3; Vírus Sincicial Respiratório e Metapneumovírus) por imunofluorescência e de Rotavírus e Adenovírus em fezes por testes imunocromatográficos.

Fazem-se ainda culturas de amostras em meio Sabouraud para pesquisa de fungos.

VII. CONTROLO DE QUALIDADE

Num laboratório o mais importante é ter um bom controlo de qualidade, ao longo de das diferentes etapas do processamento das amostras - Figura 13. Desde a etapa pré-analítica que compreende a colheita das amostras biológicas segundo as indicações definidas para cada tipo de amostra, o seu transporte e conservação em meio e temperatura adequados e correta identificação. Na etapa analítica, onde ocorre o processamento das amostras até à obtenção de um resultado, é importante a gestão dos equipamentos com a correta manutenção, controlo e calibração de modo a se poder ter a máxima confiança nos resultados que estes fornecem. E na etapa pós-analítica com a validação dos resultados pelos responsáveis de cada área, de acordo com a informação clínica e histórico do doente.

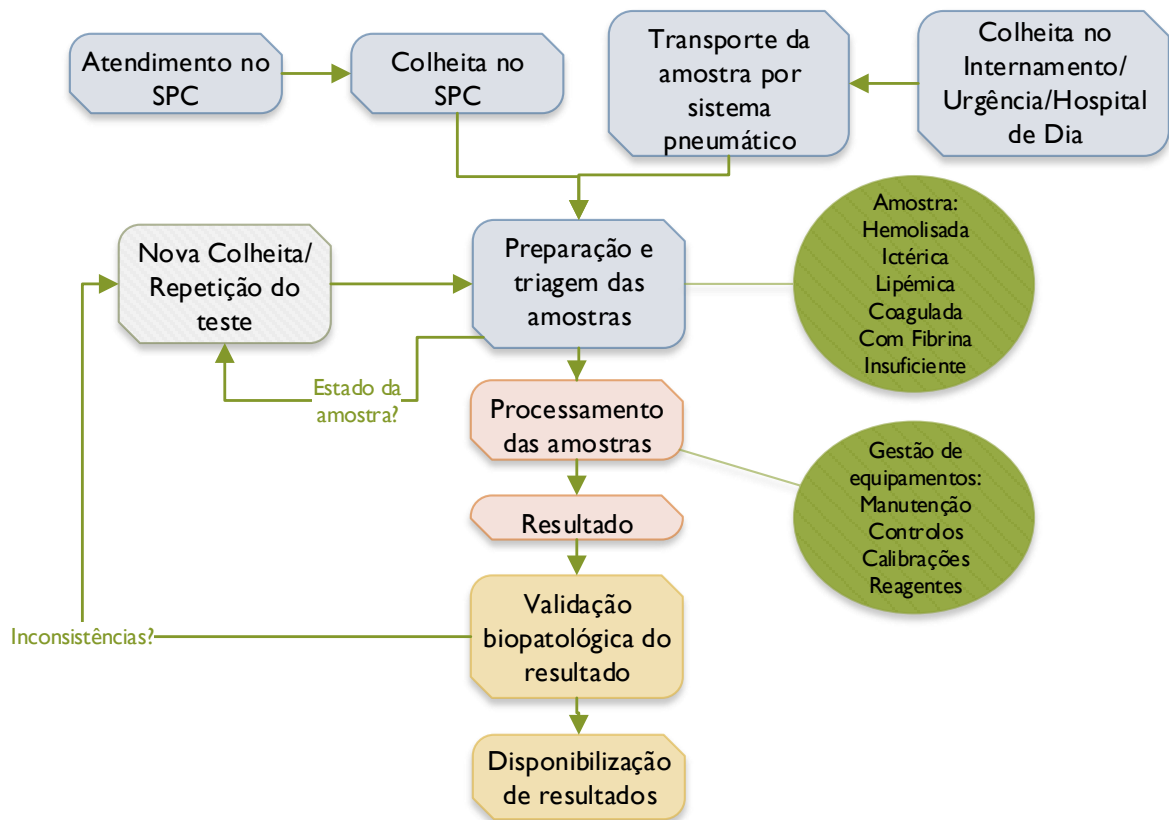


Figura 13: Etapas pré-analítica (azul), analítica (vermelho) e pós-analítica (amarelo) de uma amostra.

De modo a ter a maior qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório, a todos os equipamentos são feitas manutenções, que podem ser diárias, semanais e/ou mensais, e todos os dias são verificados e atestados caso seja necessário, os reagentes, soluções e outros consumíveis essenciais ao correto funcionamento dos mesmos. Todos os dias são também passadas amostras controlo de características conhecidas aos equipamentos, que

podem ser de diferentes níveis. Os resultados entram diretamente para as cartas de controlo, o que permite ao TSS ou médico responsável analisar se o valor está dentro de valores de decisão clínica aceitáveis, e se o equipamento para determinado analito tem tido um comportamento estável ou se poderá estar a entrar em erro sistemático ou pontual. Caso isto aconteça, deve-se tentar analisar qual será a causa do erro – desde instabilidade dos reagentes até problemas no sistema do equipamento – e tentar corrigi-la, passando de novo o controlo ou procedendo a uma calibração do método. É importante que os controlos sejam validados de modo a que depois seja possível começar a processar amostras de doentes.

Existe também uma avaliação externa de qualidade, que é feita por entidades independentes, as quais enviam amostras para os diferentes laboratórios, que devem ser processadas como se fossem amostras de doentes e cujos resultados devem ser reportados dentro de um prazo que está previamente estipulado por essas entidades. Recebe-se depois um relatório detalhado com a avaliação do desempenho do laboratório em comparação com os resultados que seriam esperados para as amostras e em comparação com outros laboratórios e com as mesmas metodologias.

Tudo isto são critérios fundamentais que permitem ter confiança no trabalho realizado pelo laboratório e que permitem que os doentes tenham um acompanhamento de qualidade.

VII. CONCLUSÃO

O estágio que realizei permitiu integrar e acompanhar a realidade de um laboratório de análises clínicas no meio hospitalar, desde as colheitas e receção de amostras, passando pelo processamento das mesmas e por fim a avaliação e validação dos resultados. Em cada laboratório pude aplicar os conhecimentos teóricos e práticos obtidos durante o mestrado, adquirir competências técnicas e alargar os meus conhecimentos uma vez que todos os dias chegam novas amostras de doentes com as mais diversas patologias que têm que ser devidamente analisadas e cujos resultados devem ser interpretados. Nesta área é muito importante ter espírito crítico que nos faça questionar a validade dos resultados de maneira a encontrar e prevenir possíveis erros ao longo do processo analítico.

O trabalho desenvolvido diariamente no laboratório envolve toda uma equipa de diferentes profissionais, todos eles necessários e focados em fornecer resultados de qualidade a quem necessite de recorrer ao laboratório como meio de prevenção, monitorização ou complemento de diagnóstico.

O estágio foi uma mais valia no meu percurso uma vez que me permitiu obter experiência no trabalho que se realiza no laboratório e permitiu ainda o contacto direto com profissionais experientes que me transmitiram conhecimentos essenciais para o meu futuro profissional.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. CARR J., Rodak B., Clinical Hematology Atlas, Saunders Elsevier, Missouri, 4th Ed (2013).
2. COULTER WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Paper presented at National Electronics Conference, Chicago, IL, 1956; October 3.
3. BAIN B., Bates I., Laffan M., Lewis S., Dacie and Lewis Practical Haematology, Churchill Livingstone, 11th Ed. (2011).
4. THEML H., Diem H., Haferlach T., Color Atlas of Hematology, Thieme, 2nd Ed (2004).
5. BAIN B., Células Sanguíneas: um guia prático, Artmed, 3 Ed (2004).
6. MUNKER R., Hiller E., Glass J., Paquette R., Modern Hematology: Biology and Clinical Management, Humana Press, 2nd Ed (2007).
7. HOFFBRAND A., Moss P., Essential Haematology, Wiley-Blackwell, 6th Ed (2011).
8. BURTIS C., Ashwood E., Bruns D., Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Elsevier Saunders, Missouri, 5th Ed (2012).
9. TEFFERI A, Lasho TL, Jimma T, et al. One Thousand Patients With Primary Myelofibrosis: The Mayo Clinic Experience. *Mayo Clinic Proceedings*. (2012).
10. CDC- Center for Disease Control and Prevention, Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis: Laboratory Testing, www.cdc.gov/epstein-barr/laboratory-testing.html [Acedido a 13/06/2016].
11. CDC- Center for Disease Control and Prevention, Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection: Interpretation of Laboratory Tests, www.cdc.gov/cmvc/clinical/lab-tests.html, [Acedido a 13/06/2016].
12. CDC- Center for Disease Control and Prevention, Q Fever: Symptoms, Diagnosis and Treatment; www.cdc.gov/qfever/symptoms/index.html#lab [Acedido a 13/06/2016].
13. LOURO E., Leitão J., et al, Febre escarso-nodular: uma zoonose benigna?, Revista da sociedade portuguesa de medicina interna, Vol.13, N° 1, (Jan/Mar 2006).
14. CDC, Sexually Transmitted Diseases: Treatment Guidelines 2015, Recommendations and Reports, Vol.64, No.3, (05/06/2015).
15. GALLEGO A., Lucena E., et al, El proteinograma en la práctica clínica, Medicina Integral, Vol.38, N.3, (08/2011).
16. REIBER H., Peter JB., Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs, J Neurol Sci., (2001).
17. WIJK A., Høier-Madsen M., Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells, Journal of Autoimmunity, No. 35, 276-290, (2010).

18. DELLAVANCE A., Júnior A., I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de Fan Hep-2, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 207-216, (2002).

19. WIJK AS; van Venrooij WJ., Pruijn GJ., All you wanted to know about anti-CCP but were afraid to ask, *Autoimmun Rev.*, (12/2010).

20. RADICE A., Sinico RA., Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), *Autoimmunity*, (02/2005).

21. CONRAD K. Anti-intestinal goblet cell antibodies. *Autoantibodies* (2007).

22. STRASSBURG CP et al. Autoantibodies against glucuronosyltransferase differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* (1996).

23. RASHTAK S, Murray JA. Review Article: Celiac Disease, New Approaches to Therapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 768-781, (04/2012).

24. KUPFER SS., Jabri B., Celiac Disease Pathophysiology. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*, (08/2012).