

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA**



**RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

Rita Manuel Lourenço Perez da Graça Camarate de Campos

Lisboa, 2011

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA**



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Estágio em Hematologia – Laboratório de Análises Clínicas Ampath

Orientação: Dr.^a Doreen Swartz

Estágio em Imunologia – Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Orientação: Dr.^a Maria Filomena Pereira Coimbra

Estágio em Microbiologia – Laboratório Médico Dr.^a Quintino Rogado

Orientação: Dr.^a Maria Hortênci Pacheco Arruda Albergaria e Melo

Tema de Revisão – Importância das cadeias leves livres no diagnóstico, prognóstico e monitorização das discrasias plasmocitárias

Orientação: Prof.^a Dr.^a Leonor Correia

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Rita Manuel Lourenço Perez da Graça Camarate de Campos

Lisboa, 2011

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1ª PARTE.....	8
RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA	9
OBJECTIVO	9
INTRODUÇÃO	9
1. SECTOR DA TRIAGEM.....	11
1.1 <i>Triagem das amostras</i>	11
1.2 <i>Velocidade de sedimentação</i>	11
2. SECTOR DOS HEMOGRAMAS.....	15
2.1 <i>Hemograma</i>	15
2.2 <i>Contagem de reticulócitos</i>	20
2.3 <i>Execução de esfregaços do sangue periférico</i>	22
3. SECTOR DA MICROSCOPIA	24
3.1 <i>Observação de esfregaços do sangue periférico</i>	24
3.2 <i>Pesquisa de Plasmódio</i>	25
4. SECTOR DO ESTUDO DA HEMOSTASE	30
4.1 <i>Equipamentos e parâmetros</i>	30
4.2 <i>Técnicas manuais</i>	36
5. SECTOR DA IMUNO-HEMATOLOGIA	37
5.1 <i>Grupo sanguíneo</i>	37
5.2 <i>Teste de Coombs Directo</i>	40
5.3 <i>Teste de Coombs Indirecto</i>	41
5.4 <i>Controlo de qualidade interno</i>	42
6. SECTOR DOS TESTES ESPECÍFICOS.....	43
6.1 <i>Prova de Falciformação Experimental</i>	43
6.2 <i>Resistência Osmótica</i>	44
6.3 <i>Detecção de glucose-6-fosfato desidrogenase</i>	46
6.4 <i>Titulação de aglutininas frias</i>	48
AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE	50
CONCLUSÃO	51
BIBLIOGRAFIA.....	53
ANEXOS.....	54
RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA	59
OBJECTIVO	59
INTRODUÇÃO	59
1. SECTOR DA IMUNOQUÍMICA.....	61
1.1 <i>Nefelometria</i>	61
1.2 <i>Electroforese</i>	68
1.3 <i>Imunofixação</i>	71
1.4 <i>Estudo das proteínas urinárias</i>	72
1.5 <i>Estudo das proteínas do LCR</i>	73
1.6 <i>Pesquisa de crioglobulinas</i>	75
2. SECTOR DA AUTOIMUNIDADE.....	76
2.1 <i>Fundamento dos métodos</i>	76
3. SECTOR DA SEROLOGIA	82
3.1 <i>Serologia para Brucella</i>	82
3.2 <i>Serologia para Salmonella</i>	83
3.3 <i>Serologia para Streptococcus pyogenes</i>	84

3.4 Serologia para <i>Treponema pallidum</i>	85
3.5 Serologia para <i>Rickettsia conorii</i>	88
3.6 Serologia para o vírus Epstein-Barr.....	88
3.7 Serologia para <i>Echinococcus granulosos</i>	90
3.8 Detecção do antigénio galactomanano de <i>Aspergillus</i>	90
3.9 Titulação do factor reumatóide.....	91
4. SECTOR DOS MARCADORES TUMORAIS.....	92
4.1 Equipamento.....	93
4.2 Fundamento.....	93
4.3 Parâmetros.....	94
CONTROLO DE QUALIDADE.....	95
Controlo de qualidade interno.....	95
Avaliação externa da qualidade.....	96
CONCLUSÃO.....	97
BIBLIOGRAFIA.....	98
RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA.....	99
OBJECTIVO.....	99
INTRODUÇÃO.....	99
1. EXAME MICROSCÓPICO.....	101
1.1 Introdução.....	101
1.2 Exame a fresco.....	101
1.3 Exame após coloração.....	101
2. MEIOS DE CULTURA.....	107
2.1 Introdução.....	107
2.2 Meios de cultura.....	109
3. TESTES DE IDENTIFICAÇÃO.....	115
3.1 Introdução.....	115
3.2 Testes de identificação.....	115
4. TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS.....	121
4.1 Introdução.....	121
4.2 Teste de sensibilidade aos antibióticos.....	121
5. MARCHA GERAL DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS.....	123
5.1 Urocultura.....	123
5.2 Exsudado vaginal.....	126
5.3 Exsudado uretral.....	128
5.4 Exsudado nasal.....	130
5.5 Exsudado faríngeo.....	131
5.6 Expectoração.....	132
5.7 Exsudado purulento.....	134
5.8 Coprocultura.....	135
5.9 Exame parasitológico das fezes.....	136
6. PESQUISAS ORIENTADAS.....	139
6.1 Pesquisa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	139
6.2 Pesquisa de <i>Mycoplasma</i>	140
6.3 Pesquisa de <i>Chlamydia</i>	142
AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....	145
CONCLUSÃO.....	146
BIBLIOGRAFIA.....	147
2ª PARTE.....	148

**IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES NO DIAGNÓSTICO,
PROGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DAS DISCRASIAS PLASMOCITÁRIAS 149**

LISTA DE ABREVIATURAS	150
INTRODUÇÃO	151
1. HISTÓRIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES	153
2. BIOLOGIA DAS CADEIAS LEVES DAS IMUNOGLOBULINAS.....	157
2.1 Estrutura.....	157
2.2 Síntese.....	158
2.3 Eliminação e metabolização.....	161
3. IMUNOENSAIO PARA O DOSEAMENTO DAS CADEIAS LEVES LIVRES.....	164
3.1 Intervalos de referência.....	164
3.2 Limitações técnicas.....	165
3.3 Doseamento das cadeias leves livres na urina	166
4. DISCRASIAS PLASMOCITÁRIAS	167
4.1 Classificação.....	167
4.2 Mieloma múltiplo.....	168
4.3 Plasmocitoma solitário ósseo	171
4.4 Patologias com depósito de cadeias leves monoclonais.....	171
4.5 Gamapatia monoclonal de significado indeterminado	172
5. IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES NO DIAGNÓSTICO	174
6. IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES NO PROGNÓSTICO.....	178
6.1 Gamapatia monoclonal de significado indeterminado	178
6.2 Mieloma múltiplo assintomático.....	180
6.3 Plasmocitoma solitário ósseo	182
6.4 Mieloma Múltiplo	182
6.5 Amiloidose a cadeias leves	184
7. IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES NA MONITORIZAÇÃO.....	185
7.1 Critérios para avaliação de resposta publicados	185
7.2 Avaliação da monitorização terapêutica	186
CONCLUSÕES.....	190
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	192

RESUMO

O presente Relatório de Estágio é parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e é apresentado em duas partes. Da primeira fazem parte os relatórios relativos aos estágios profissionais nas valências de Hematologia (Laboratório de Análises Clínicas Ampath, África do Sul), Imunologia (Instituto Português de Oncologia de Lisboa) e Microbiologia (Laboratório Médico Dr.^a Quintino Rogado, Sacavém).

Os relatórios de estágio das diferentes valências têm como objectivo fazer uma apresentação dos locais onde decorreram e descrever a actividade desenvolvida, destacando nomeadamente os parâmetros efectuados, o tipo de amostra, os equipamentos utilizados, o fundamento dos métodos, o controlo de qualidade e os aspectos mais relevantes no que diz respeito à experiência desenvolvida e ao enquadramento dos conhecimentos adquiridos no contexto geral do Laboratório e da sua aplicação à Clínica.

Na segunda parte é apresentada uma revisão actualizada do tema “Importância das cadeias leves livres no diagnóstico, prognóstico e monitorização das discrasias plasmocitárias”.

Nos últimos anos ressurgiu e alargou-se o interesse pelas CLL (cadeias leves livres). O entendimento dos mecanismos de regulação e o desenvolvimento de novos testes que permitiram a sua quantificação, abriram as portas a novas abordagens, aumentando a sua importância no estudo das discrasias plasmocitárias.

No contexto do diagnóstico, o doseamento de CLL no soro, juntamente com a electroforese das proteínas e a imunofixação constituem um protocolo com excelentes níveis de sensibilidade e especificidade permitindo para a maioria das situações prescindir dos testes na urina de 24 horas. Estudos recentes mostram também que as CLL no momento do diagnóstico são um factor de risco independente sugerindo a sua determinação para avaliação de prognóstico. Na monitorização e avaliação da remissão são também definidas as situações e os protocolos que recomendam a sua utilização.

ABSTRACT

The present Internship Report is part of the program of the Master in Clinical Pathology of the School of Pharmacy, University of Lisbon. The Internship Report is divided in two parts. In the first part, I describe the professional internships in Hematology (Ampath Clinical Laboratory, South Africa), Immunology (Portuguese Institute of Oncology of Lisbon) and Microbiology (Medical Laboratory Dr. Quintino Rogado, Sacavém).

The internship reports on the different areas present the laboratories where the internships took place as well as describe my activities in those laboratories, highlighting the tests performed, type of sample, the equipment used, the methods principles, the quality controls and the most relevant aspects of the acquired experience, both from a technical and a clinical point of view.

On the second part of this Internship Report, I conduct an updated review of the “Importance of free light chains in the diagnosis, prognosis and response assessment of plasma cell disorders”.

Over the last years, the interest in FLC (free light chains) has been resurfaced and widened. The learning about regulation mechanisms as well as the development of new tests for quantifying the FLC opened the door to new approaches, increasing its importance in the study of plasma cell disorders.

On the context of diagnosis, the measurement of serum FLC in combination with protein electrophoresis and immunofixation is a protocol with high levels of sensibility and specificity, allowing in most of the cases to replace 24-hour urine tests. Recent studies also show that the FLC at the time of diagnosis is an independent risk factor suggesting its inclusion on the evaluation of prognosis. The cases and protocols that recommend the use of FLC in response assessment are also defined.

1ª PARTE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

OBJECTIVO

O Estágio profissional na valência de Hematologia é parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Departamento de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas Ampath em Pretória, África do Sul, sob a orientação da Dr.^a Doreen Swartz, no período compreendido entre Junho de 2009 e Junho de 2010.

O presente relatório tem como objectivo fazer uma apresentação do local de estágio e descrever a minha actividade no referido laboratório, destacando nomeadamente os parâmetros efectuados, o tipo de amostra, os equipamentos utilizados, o fundamento dos métodos, o controlo de qualidade e os aspectos mais relevantes no que diz respeito à experiência adquirida, quer do ponto de vista técnico quer do ponto de vista da sua aplicação à clínica.

INTRODUÇÃO

O Laboratório de Análises Clínicas Ampath é uma instituição privada prestadora de cuidados de saúde na área das análises clínicas com uma capacidade de resposta multidisciplinar actuando em diversas áreas: Bioquímica, Endocrinologia, Hematologia, Imunologia, Serologia, Microbiologia, Virologia e Biologia Molecular.

As suas mais de 150 instalações, distribuídas pelas nove províncias da África do Sul, incluindo laboratórios regionais e postos de colheita, disponibilizam mais de 2000 parâmetros analíticos, garantindo uma cobertura de 24 horas, sete dias por semana. O Ampath encontra-se acreditado pelo *South African National Accreditation System* de acordo com a ISO 15189:2007 e serve cerca de 40% dos utilizadores do sector privado de saúde da África do Sul.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

O Departamento de Hematologia do Laboratório Ampath em Pretória onde realizei o meu estágio encontra-se actualmente organizado em seis sectores:

1. Triage – triagem das amostras e execução do parâmetro velocidade de sedimentação.
2. Hemograma – contagem de células, plaquetas e reticulócitos; selecção e execução de esfregaços do sangue periférico.
3. Microscopia – observação de esfregaços do sangue periférico e pesquisa de hematozoários.
4. Estudo da Hemostase – avaliação de síndromes trombóticas e hemorrágicas e monitorização da terapêutica anticoagulante.
5. Imuno-hematologia – fenotipagem eritrocitária e testes de Coombs.
6. Testes específicos – estudo de hemoglobinopatias e outras patologias associadas ao eritrócito (prova de falciformação experimental; resistência osmótica; detecção da glucose-6-fosfato desidrogenase; titulação de aglutininas frias).

O plano de Estágio para a Valência de Hematologia foi o seguinte:

- a) Identificação do tipo de produto biológico necessário à execução de cada parâmetro.
- b) Conhecimento das condições exigidas para a obtenção dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos técnicos.
- c) Conhecimento das condições de separação e armazenamento dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos de manipulação.
- d) Execução dos parâmetros de Hematologia básica.
- e) Execução de metodologias relacionadas com a detecção de hemoglobinopatias.
- f) Execução de metodologias relacionadas com o diagnóstico e a monitorização de doenças hemato-oncológicas.
- g) Execução de metodologias relacionadas com o diagnóstico e a monitorização de patologias trombóticas e hemorrágicas.
- h) Manuseamento, tratamento e interpretação dos resultados das amostras de controlo de qualidade interno e de avaliação externa da qualidade.

1. SECTOR DA TRIAGEM

1.1 Triagem das amostras

Nesta secção é dada entrada das amostras destinadas à Hematologia no sistema informático do laboratório (Meditech) através do código de barras colocado no tubo de amostra durante a colheita. Primeiro confirma-se que o nome escrito no código de barras coincide com o nome no sistema informático e depois procede-se à distribuição das amostras para os diferentes sectores consoante a natureza dos testes requisitados.

1.2 Velocidade de sedimentação

Os técnicos da triagem são responsáveis pela execução deste parâmetro.

Amostra

Sangue total colhido em tubo com EDTA.

Fundamento

A velocidade de sedimentação (VS) avalia a queda espontânea dos glóbulos vermelhos em suspensão no plasma. Os GV devido à sua forma de disco bicôncavo têm tendência a acamarem-se – força de coesão. Por outro lado, têm uma densidade elevada e cargas eléctricas negativas, comparativamente ao plasma que é menos denso e cujos constituintes têm cargas eléctricas positivas – contra-corrente plasmática. Quanto maior o número de GV maior a contra-corrente plasmática e portanto, menor a velocidade de sedimentação.

Etapas da VS:

1. Período inicial de agregação com formação de roleaux (≈ 10 minutos).
2. Período de sedimentação rápida com queda dos roleaux a velocidade constante (≈ 40 minutos).
3. Período final de sedimentação com empilhamento dos glóbulos no fundo do tubo (≈ 10 minutos).

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Técnica

Método de Wintrobe:

1. Homogeneizar a amostra (tubo do hemograma).
2. Com uma pipeta Pasteur encher o tubo de vidro até a marca 0 mm.
3. Colocar o tubo no suporte.
4. Leitura a altura (em mm) da coluna de plasma, isenta de GV, ao fim de 60 minutos.

Factores que afectam a VS

Globulares

- Aumento da formação de rouleaux provoca aumento da VS
A velocidade de sedimentação de uma partícula é directamente proporcional ao seu peso e inversamente proporcional à sua área, os rouleaux têm uma relação peso/área maior que os eritrócitos isolados, e portanto, sedimentam mais rapidamente. Assim, todos os factores que facilitem a formação de rouleaux aumentam a VS.
- Número de glóbulos vermelhos:
 - aumento do n.º de GV provoca diminuição da VS
 - diminuição do n.º de GV provoca aumento da VS
- Tamanho dos glóbulos vermelhos:
 - presença de micrócitos aumenta a VS
 - presença de macrócitos diminui a VS
- Forma dos glóbulos vermelhos:
 - Formas anormais provocam diminuição da VS

Plasmáticos

- Aumento da viscosidade do sangue provoca diminuição da VS
- Aumento do fibrinogénio provoca aumento da VS
- Aumento das proteínas α , β e γ globulinas determina aumento da VS

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Mecânicos

- Altura e diâmetro do tubo
- Posição do tubo (vertical)
- Vibrações
- Enchimento do tubo (sem bolhas de ar)
- Temperatura baixa – ↓VS
- Tempo de espera (os GV tornam-se esféricos)
- Anticoagulante (relação anticoagulante/sangue)

O aumento da VS está associado a diferentes patologias, designadamente - infecções agudas e crónicas (ex. tuberculose e sífilis); inflamações agudas (ex. apendicite); doenças reumáticas; leucemias e síndromes neoplásicas; mielomas e plasmocitomas e anemias.

No entanto, existem situações fisiológicas que também são acompanhadas de um aumento da VS, tais como:

- sexo feminino
- idade
- gravidez (a partir do 3º mês)
- período menstrual

Uma diminuição patológica da VS ocorre nas poliglobulias; casos de hipofibrinogénia e anomalias na forma dos GV (ex. esferocitose e drepanocitose).

A VS é um parâmetro inespecífico, mas é económico e de fácil execução. Valores baixos indicam-nos baixa probabilidade de doença neoplásica ou inflamatória. A sua normalização é indicio de melhoria de um processo agudo. Mantém-se assim um exame de utilidade indiscutível e dos mais requisitados na rotina laboratorial.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é efectuado diariamente com dois controlos comerciais – normal e patológico e em dias alternados é realizado um controlo de reprodutibilidade com uma amostra aleatória: os resultados não devem diferir mais de 20% para leituras abaixo de 20mm/h e não devem diferir mais de 10% para leituras acima de 21mm/h. Se os resultados estiverem entre 1 e 9 estes podem diferir mais ou menos 1mm/h.

2. SECTOR DOS HEMOGRAMAS

2.1 Hemograma

Amostra

Sangue total colhido em tubo com EDTA.

O EDTA actua por quelação do cálcio impedindo assim a coagulação do sangue. As vantagens deste anticoagulante são as seguintes:

- assegura a conservação das células a 4°C/24h
- conserva a morfologia dos leucócitos e eritrócitos até 2 horas após a colheita
- permite na maioria dos casos a correcta contagem de plaquetas

Equipamento

ADVIA 2120 acoplado com Autoslide (Siemens).

O ADVIA 2120 é um analisador hematológico automático capaz de processar 120 hemogramas ou 74 hemogramas com contagem de reticulócitos por hora. O sistema apresenta três modos de aspiração da amostra: manual com o tubo aberto, manual com o tubo fechado e automático, requerendo todos o mesmo volume de amostra (157µl). O Autoslide permite a extensão e coloração da lâmina a partir do tubo no qual é feito o hemograma.

Fundamento

A amostra é aspirada sob vácuo e após passar através de um filtro de forma a remover fibrina e pequenos coágulos atinge a válvula de divisão da amostra (*shear valve*). Nesta fase a amostra é separada em alíquotas dependendo do(s) teste(s) requerido(s). Os protocolos disponíveis são cinco:

- Contagem celular
- Contagem celular e diferencial
- Contagem celular, diferencial e contagem de reticulócitos
- Contagem de reticulócitos

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

- Contagem celular e contagem de reticulócitos

À medida que a amostra atinge a *shear valve* passa por um detector de condutividade, a amostra conduz corrente e é esta alteração na condutância que informa o sistema que a amostra atingiu a válvula. O sistema ao receber este sinal cessa a aspiração e a válvula roda para a posição de dispensar. Na zona da *shear valve* encontram-se diferentes válvulas que abrem dependendo do protocolo escolhido. A abertura destas válvulas permite que sejam retiradas as alíquotas de amostra necessárias. As alíquotas de amostra são então diluídas com os reagentes apropriados dispensados sob pressão e transportadas para as câmaras de reacção respectivas. Após um período de incubação para que as reacções ocorram, alíquotas da mistura de reacção são retiradas das câmaras e feitas passar sob pressão através de um citómetro de fluxo (*flow cell*) para serem analisadas (excepto na determinação da hemoglobina). A coluna de amostra é rodeada por um fluido (reagente *sheat*) que passa pela *flow cell* a uma pressão menor e é utilizado para estabilizar a posição e o tamanho do fluxo de amostra. À medida que cada célula passa individualmente pelo fluxo de luz é detectada a sua dispersão e absorção que são depois utilizadas para determinar, dependendo do método, o seu tamanho, densidade e coloração.

Contagem de leucócitos

O ADVIA 2120 executa duas contagens de leucócitos diferentes de forma a obter o diferencial.

Método da peroxidase

O método da peroxidase é o método primário para obter o diferencial. O método utiliza três reagentes para corar a mieloperoxidase intra-celular:

1. 12µl de amostra são diluídos com o reagente Perox 1. Este reagente contém surfactantes (sódio dodecil sulfato e Brij-35) que associados ao calor na câmara de reacção lisam os eritrócitos. A temperatura na câmara de reacção é monitorizada e deve ser de 70°C+/-2.
2. Os reagentes Perox 2 e 3 são então adicionados à câmara de reacção. O 4-cloro-1-naftol no Perox 2 actua como substrato permitindo que o peróxido de hidrogénio do Perox 3 forme um precipitado negro nos grânulos dos leucócitos com peroxidase activa.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

3. A amostra passa através da *flow cell* num fluxo de células individuais onde a dispersão e a absorção da luz é determinada para cada célula. A dispersão da luz determina o tamanho da célula e a absorção o nível de coloração.
4. Os sinais são analisados e tratados pelo *software* e apresentados sob a forma de histograma.
5. São determinados valores para o número de leucócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e *Large Unstained Cells* (LUC). Os linfócitos e os basófilos aparecem agrupados e por isso é necessário um método adicional para determinar a contagem de basófilos.

A grande limitação do método da peroxidase é o de ser dependente da presença de mieloperoxidase para que a reacção ocorra. A deficiência em mieloperoxidase tem uma incidência na população de cerca de 1/500 e faz com que os neutrófilos não sejam corados aparecendo no histograma na zona dos LUC.

Método basófilo

O método basófilo é o método primário para obter a contagem total de leucócitos. O método utiliza a resistência dos basófilos à lise por um ácido para os diferenciar dos outros leucócitos.

1. 12µl de amostra são diluídos com o reagente Baso. Este reagente contém ácido ftálico e surfactantes, que em conjunto com a temperatura elevada na câmara de reacção (33°C +/- 1) provocam a lise dos eritrócitos e das plaquetas e do citoplasma de todos os leucócitos excepto dos basófilos.
2. Os leucócitos passam pela *flow cell* onde o tamanho das células e a sua complexidade é detectada e registada no histograma.
3. Este método determina valores para a contagem total de leucócitos, basófilos, células polimorfonucleares, células mononucleadas e blastos.
4. A contagem de basófilos é subtraída da contagem de linfócitos + basófilos obtida no método da peroxidase de forma a completar o diferencial.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Contagem de eritrócitos e plaquetas

Os eritrócitos e as plaquetas são determinados em simultâneo através de um método que se baseia na teoria de Mie sobre a dispersão da luz das esferas. A amostra (2µl) é diluída num reagente que contém sódio dodecil sulfato (SDS) e glutaraldeído, que provoca a esferificação dos eritrócitos e das plaquetas. A esferificação isovolumétrica das células elimina a forma enquanto factor de variabilidade. As células são posteriormente analisadas no citómetro de fluxo.

Parâmetros para o glóbulo vermelho

Hemoglobina

A determinação da hemoglobina é efectuada por um método colorimétrico:

1. Os eritrócitos são lisados de forma a libertar a hemoglobina.
2. O ião ferro da hemoglobina é oxidado do estado ferroso para o estado férrico, o qual depois se combina com o cianeto do reagente formando o produto de reacção.
3. As leituras ópticas são obtidas a 546nm.

Índices eritrocitários

a) Volume globular médio

O VGM (fl) corresponde ao tamanho médio do glóbulo vermelho e calcula-se directamente a partir do histograma dos glóbulos vermelhos.

Quando o VGM está aumentado, os eritrócitos são em média maiores e fala-se em macrocitose e quando está diminuído, os eritrócitos são em média menores e fala-se em microcitose.

b) Hemoglobina Globular Média

A HGM é a quantidade de hemoglobina por glóbulo vermelho. É obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\text{HGM (pg)} = (\text{HB/GV}) \times 10$$

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

c) Concentração da Hemoglobina Globular Média

A CHGM é a razão entre a concentração de HB e o hematócrito. É obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\text{CHGM (g/dl)} = (\text{HB/HCT}) \times 100$$

HGM e CHGM traduzem conceitos de normocromia e hipocromia, referindo-se ao conteúdo dos eritrócitos em hemoglobina. Não existe hipercromia pois em condições normais o eritrócito tem toda a hemoglobina que pode conter. Casos de HGM aumentada devem-se, em geral, a macrocitose. A CHGM só raramente está aumentada, por exemplo em situações em que há um certo grau de desidratação do eritrócito, como na esferocitose hereditária.

d) Dispersão eritrocitária

O estudo da distribuição dos glóbulos vermelhos detecta anomalias eritrocitárias relacionadas com anisocitose, que significa presença de células de diferentes tamanhos. É obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{RDW (\%)} = 100 \times (\text{SD do histograma dos GV} / \text{VGM})$$

O RDW tem aplicação na classificação de anemias sendo, em geral, alto em anemias carenciais (ferro, vitamina B12 e ácido fólico) e normal nas anemias hipoproliferativas.

e) Hematócrito

O hematócrito é a razão entre os glóbulos vermelhos e o plasma e é expresso como uma percentagem do volume total de sangue. É obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{HCT} = (\text{GV} \times \text{VGM}) / 10$$

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Validação

Os hemogramas são analisados tendo em consideração vários factores:

- sexo
- idade
- histórico dos resultados
- outros parâmetros relevantes (exs. VS, ferro, ferritina, transferrina, enzimas hepáticos)

Se necessário são repetidos e/ou é efectuado um esfregaço para observação microscópica.

Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno dos hemogramas é efectuado duas vezes por dia com três controlos comerciais – baixo, normal e alto. Na mesma altura é efectuado também um controlo de reprodutibilidade com uma amostra aleatória para os valores de leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, VGM e plaquetas.

2.2 Contagem de reticulócitos

Amostra

Sangue total colhido em tubo com EDTA.

Fundamento

Os reticulócitos são a forma imatura na qual os eritrócitos são libertados para a circulação a partir da medula óssea. Não têm núcleo mas ainda contêm mitocôndrias, ribossomas e elementos do complexo de Golgi suficientes para completar o citoesqueleto e os 20% remanescentes da síntese de hemoglobina. A maturação final em eritrócitos ocorre entre 24-48 horas após a libertação. A taxa de libertação de reticulócitos para a circulação geralmente é igual à taxa de destruição de eritrócitos velhos pelo baço e pelo fígado.

Os reticulócitos não podem ser distinguidos dos eritrócitos maduros em esfregaços de sangue corados pelos corantes Romanovski, mas quando o sangue é incubado com o corante básico, azul

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

brilhante de cresil, forma-se um precipitado reticular de cor azul nos reticulócitos devido à interação do corante com o RNA ribossomal.

Em caso de anemia pode ser um exame de extrema utilidade para distinguir as situações em que há deficiente produção da medula (anemia arregenerativa) das que resultam de perdas ou destruição dos glóbulos à periferia (anemia regenerativa). No primeiro caso há poucos ou nenhuns reticulócitos, no segundo estão aumentados porque a medula responde acelerando a eritropoiese e lançando eritrócitos jovens em circulação.

Técnica

Técnica automática no ADVIA 2120

1. O reagente autoRetic contém um surfactante que provoca a esferificação isovolumétrica das células.
2. O RNA dos reticulócitos é corado com o corante oxazina 750.
3. A mistura de reacção passa através do laser onde a sua dispersão é usada para determinar o tamanho da célula e a absorção para determinar o conteúdo em RNA.

Através desta técnica para além do valor absoluto e percentagem de reticulócitos é também reportada a concentração média de hemoglobina nos reticulócitos (CHr), a qual pode funcionar como um indicador precoce de anemia ferropénica sensível e específico.

Técnica manual

Quando o valor de reticulócitos obtido pela técnica automática no ADVIA 2120 é superior a 5% o resultado é sempre confirmado por uma contagem manual.

Num tubo de hemólise juntar:

1. 2 gotas de corante azul brilhante de cresil + 2 gotas de sangue.
2. Homogeneizar.
3. Deixar em contacto – 37°C/15 minutos.
4. Colocar uma gota numa lâmina e fazer o esfregaço.
5. Deixar secar.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

6. Observar com objectiva de imersão, restringindo o campo do microscópio (sector da microscopia).
7. Contar o n.º de reticulócitos (N)/1000 GV.
8. Resultado - N.º Reticulócitos em % = $N / 1000 (GV + Ret.) \times 100$.

Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno dos reticulócitos é efectuado duas vezes por dia com três controlos comerciais – baixo, normal e alto.

2.3 Execução de esfregaços do sangue periférico

Os esfregaços do sangue periférico são efectuados e corados de forma automática pelo Autoslide acoplado ao ADVIA 2120 ou manualmente.

Técnica manual

Execução do esfregaço

1. Misturar o sangue invertendo o tubo suavemente. Retirar a rolha.
2. Retirar um pouco de sangue do tubo com a pipeta Pasteur e colocar uma pequena gota de sangue sobre uma lâmina.
3. Com uma mão, segurar a lâmina nos cantos opostos à extremidade que contem o sangue. Com a outra mão segurar outra lâmina ou lamela, que irá servir para espalhar o sangue, e colocar sobre a primeira de modo a fazerem um ângulo de cerca de 30°. Este ângulo é mantido durante a execução do esfregaço.
4. Puxar a lâmina/lamela superior para trás até contactar com a gota de sangue. O sangue vai-se distribuir ao longo do bordo desta lâmina.
5. Executar o esfregaço deslocando a lâmina/lamela superior suave mas rapidamente ao longo de cerca de 4 cm da lâmina inferior.
6. Secar o esfregaço ao ar.

Coloração

Em ambos os métodos, manual e automático, é efectuada a coloração May-Grunwald-Giemsa.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Acção dos corantes

Eosina – Corante ácido. Cora componentes celulares básicos designados por eosinófilos ou acidófilos, de alaranjado.

Azul-de-metileno – Corante básico. Cora componentes celulares ácidos designados por basófilos, de azul arroxeadado.

Azur de metileno – Cora granulações designadas por granulações azurófilas, de vermelho.

Células policromatófilas – Coram de acinzentado por terem proporções idênticas de componentes ácidos e básicos.

Granulações neutrófilas – Coram pela acção combinada da eosina e azul de metileno de rosa acinzentado.

3. SECTOR DA MICROSCOPIA

3.1 Observação de esfregaços do sangue periférico

O cérebro humano treinado e atento tem capacidades que ultrapassam as de qualquer máquina, em intuição e capacidade de julgar, pelo que, mesmo nos serviços com bons equipamentos automáticos, muitas são as situações que exigem observação microscópica do esfregaço.

Na observação ao microscópio do esfregaço corado são procurados aspectos que justifiquem ou complementem a informação fornecida pelo hemograma. Pesquisam-se alterações qualitativas ou quantitativas dos glóbulos brancos, glóbulos vermelhos ou plaquetas, sendo referidas no boletim de análise as indicações que se julgarem pertinentes do ponto de vista clínico.

Exemplos de informações obtidas na observação do esfregaço do sangue periférico que podem ser indicadas no boletim de análise:

- Estudo das plaquetas. Presença de agregação; anisocitose e alterações da granulação plaquetária.
- Estudo da série leucocitária. Pesquisa de células atípicas; desvios de maturação; alterações morfológicas; presença de blastos ou outras formas jovens.
- Estudo da série eritrocitária:
 - Anisocitose – diferentes tamanhos.
 - Anisocromia – células normocrómicas coexistindo com hipocrómicas.
 - Policromatofilia – células mais azuladas e maiores que um eritrócito maduro. A cor azulada deve-se ao facto de possuírem menos Hb que um eritrócito maduro e de ainda terem restos de RNA no citoplasma.
 - Poiquilocitose – diferentes formas, sem predomínio de uma em particular.
 - Formas anormais predominantes: dianócitos; dacriócitos; esferócitos; eliptócitos; acantócitos; equinócitos; esquisócitos; etc.
 - Inclusões eritrocitárias:
 - Ponteados basófilos – pequenas estruturas azul-escuras semelhantes a pontos, espalhadas de modo uniforme por toda a área hemoglobinizada do eritrócito. O ponteados resulta da precipitação de ribossomas e RNA durante a coloração.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

- Anéis de Cabot – estruturas em anel ou em forma de oito que coram de vermelho-arroxeadado. Resultam de restos de membrana nuclear ou de um fuso mitótico.
- Corpos de Howell-Jolly – pequenas inclusões arredondadas de cor avermelhada, consideravelmente maiores do que o ponteadado basófilo. Normalmente encontra-se um por eritrócito e desviado a um dos lados da célula. Correspondem a restos nucleares (ex. membrana nuclear).

3.2 Pesquisa de Plasmódio

Amostra

Sangue total colhido em tubo com EDTA. Colheita feita, de preferência, em pico febril.

Fundamento

O plasmódio, agente da malária ou paludismo, é um protozoário parasita do sangue. Existem muitas espécies de plasmódios, mas habitualmente apenas quatro parasitam o homem: *falciparum*, *vivax*, *ovale* e *malariae*. O vector biológico é o mosquito *Anopheles*. O parasita vai modificando o seu habitat conforme a etapa do ciclo evolutivo.

O ciclo assexuado (esquizogonia) inicia-se quando uma fêmea do mosquito *Anopheles* (hospedeiro definitivo) pica o homem e inocula esporozoítos infectantes, que entram nos vasos sanguíneos da pele. Os esporozoítos migram através do sangue e invadem as células do fígado. Tornam-se criptozoítos, reproduzindo-se por divisão assexuada e produzindo grande quantidade de merozoítos. Este é o ciclo exoeritrocítico, que se completa em uma a duas semanas. Os merozoítos saem das células hepáticas e invadem os eritrócitos na circulação sanguínea. Penetrando nos eritrócitos tornam-se trofozoítos (também conhecidos como formas em anel) que amadurecem através do estágio de esquizonte em 36 a 72 horas. Cada esquizonte produz 6 a 24 novos merozoítos. O tempo e o número de novos merozoítos produzidos permitem diferenciar a espécie de plasmódio. Quando o esquizonte está maduro o eritrócito sofre hemólise, libertando os merozoítos, que por sua vez invadem novos eritrócitos. O ciclo de invasão da hemácia, a esquizogonia e a ruptura da célula, repetem-se indefinidamente. Este é o ciclo eritrocítico: o

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

merozoíto invade o eritrócito → trofozoíto → esquizonte → ruptura da hemácia → libertação de merozoítos.

Mais tarde, na infecção, alguns merozoítos evoluem para microgametócitos (células sexuais masculinas) ou macrogametócitos (células sexuais femininas). O ciclo sexuado (esporogonia) começa quando os gametócitos são ingeridos por um mosquito *Anopheles* ao sugar o sangue de uma pessoa infectada.

A pesquisa de plasmódio é feita por três métodos diferentes em simultâneo:

1. Observação do esfregaço do sangue periférico
2. Pesquisa de antígenos por ensaio imunocromatográfico
3. *Quantitative Buffy Coat* (QBC)

Observação do esfregaço do sangue periférico

A identificação do plasmódio no esfregaço de sangue periférico baseia-se na fase eritrocitária do parasita. A observação do esfregaço do sangue periférico é o método de eleição para observar a morfologia dos parasitas e das hemácias, o que é muito importante para a identificação da espécie e também para a determinação da percentagem de hemácias parasitadas.

Técnica

1. Fazer um esfregaço do sangue periférico.
2. Coloração de May-Grunwald-Giemsa.
3. Observar ao microscópio com objectiva de imersão.

Plasmodium falciparum

- Hemácia parasitada igual às não parasitadas
- No S.P. encontra-se com maior frequência os trofozoítos (poliparasitismo) e os gametócitos
- Ciclo esquisogónico de 36 a 48 horas
- Esquizonte com 8 a 16 merozoítos

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Plasmodium malariae

- Hemácia parasitada mantém o diâmetro
- Invadem as hemácias maduras
- Ciclo esquisogónico de 72 horas
- Esquizonte com 6 a 8 merozoítos

Plasmodium vivax

- Hemácia parasitada superior às não parasitadas
- Invade preferencialmente os reticulócitos
- Poliparasitismo raro
- Ciclo esquisogónico de 48 horas
- Esquizonte com 16 merozoítos

Plasmodium ovale

- As hemácias parasitadas aumentam de tamanho, contornos irregulares por vezes oval de bordos dentados
- Poliparasitismo raro
- Ciclo esquisogónico de 48 horas
- Esquizonte com 6 a 12 merozoítos

Resultado

- Positivo: Observação de trofozoítos, esquizontes ou gametócitos no sangue periférico.
- Resultado em % do número de hemácias parasitadas.

Pesquisa de antígenos

O ICT Malaria Pf/Pv é um teste imunocromatográfico rápido para a detecção em sangue total do antígeno circulante do *Plasmodium falciparum* e de um antígeno comum às quatro espécies de plasmódio que parasitam o homem. O dispositivo inclui dois anticorpos imobilizados na tira do teste, um anticorpo (área de teste 1) é específico para a proteína do *Plasmodium falciparum* HRP2 (proteína 2 rica em histidina), o outro anticorpo (área de teste 2) é específico para um

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

antigénio pan-malárico presente nas quatro espécies de *Plasmodium* humanos. Uma amostra de sangue total (5µl) é aplicada na janela da amostra, a qual está impregnada com um anticorpo marcado com ouro coloidal dirigido aos dois tipos de antigénios. Quando uma amostra é positiva, os antigénios ligam-se a estes anticorpos na janela da amostra e os imunocomplexos formados migram ao longo da tira de teste onde são capturados pelos anticorpos imobilizados. Quando ocorre a captura forma-se uma linha rosa na área de teste 1 e/ou 2. Pelo contrário, quando uma amostra é negativa estas linhas não se formam. O dispositivo tem também um controlo interno (área C) com um anticorpo dirigido ao anticorpo da fase móvel para indicar que o teste foi efectuado correctamente.

Duas limitações deste ensaio são o de não permitir diferenciar infecções causadas por *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* e o facto de após terapêutica anti-malárica com eliminação do parasita o teste ainda detectar o antigénio PfHRP2 por vários dias.

Quantitative Buffy Coat

O *Quantitative Buffy Coat* (QBC) é um método qualitativo rápido que consiste na concentração dos parasitas e na sua posterior observação por fluorescência. O objectivo da utilização desta técnica é o de aumentar a sensibilidade da microscopia óptica nos casos em que a parasitémia é muito baixa.

A amostra de sangue é introduzida num capilar que contém anticoagulantes e está revestido com o corante laranja de acridina com afinidade para os ácidos nucleicos dos parasitas. No interior do capilar é introduzido um flutuador de plástico que expande as camadas celulares. Com uma microcentrífuga especialmente concebida, os capilares são centrifugados com a conseqüente separação das células coradas por gradiente de densidade. As camadas celulares separadas e expandidas são claramente identificáveis no capilar centrifugado, as hemácias permanecem na zona inferior e por cima fica a camada leucoplaquetária ou *buffy coat* (granulócitos, linfócitos/monócitos e plaquetas). As hemácias parasitadas são menos densas do que as não parasitadas concentrando-se na parte superior da camada de hemácias, embora os parasitas também possam ser observados na camada leucoplaquetária. Utilizando um suporte próprio os

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

capilares são observados ao microscópio de fluorescência na interface hemácias-granulócitos e granulócitos-linfócitos/monócitos.

As limitações desta técnica são o facto de ser um método qualitativo, requerer normalmente a posterior observação do esfregaço de sangue periférico para identificação da espécie e o de poder não detectar níveis de parasitemia muito baixos.

4. SECTOR DO ESTUDO DA HEMOSTASE

A hemostase é um processo complexo pelo qual o organismo assegura, em permanência, a prevenção das hemorragias espontâneas e a paragem das hemorragias resultantes da rotura da continuidade vascular. A reconstituição da normalidade circulatória exige a complementação da hemostase pela fibrinólise que leva à destruição da fibrina e à reparação da integridade vascular.

Classicamente, considera-se na hemostase três etapas:

1. Hemostase primária
2. Coagulação – formação de fibrina
3. Fibrinólise – destruição da fibrina e reparação da integridade vascular

A exploração da hemostase pode ter vários objectivos:

- Estudo dos síndromes hemorrágicos
- Estudo dos síndromes trombóticos
- Despiste de uma anomalia da hemostase (exame pré-operatório)
- Monitorização da terapêutica anticoagulante

4.1 Equipamentos e parâmetros

Equipamentos utilizados neste sector:

- STA-R Evolution (Stago)
- Tromboelastógrafo TEG 5000 (Haemonetics)
- Agregómetro plaquetário APACT- 4 (Labor)

STAR-R Evolution

O STA-R Evolution é um analisador automático que efectua determinações quantitativas de um grande número de parâmetros através de ensaios de coagulometria, imunoturbidimétricos e colorimétricos.

Amostra

Plasma citratado. O citrato de sódio actua por quelação do cálcio impedindo assim a coagulação do sangue (mecanismo de acção semelhante ao EDTA). Sangue total tornado incoagulável pela

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

adição de citrato de sódio (9 volumes de sangue: 1 volume de citrato) – permite a preservação dos factores da coagulação V e VIII – e centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos.

Parâmetros

Tempo de Protrombina (TP)

O processo de coagulação é desencadeado mediante incubação do plasma com quantidades óptimas de tromboplastina e cálcio. Mede-se o tempo decorrido até à formação do coágulo de fibrina. A medição do TP constitui um teste de rastreio rápido e sensível para detectar transtornos da coagulação no âmbito do sistema extrínseco (factores II, V, VII e X). Devido ao seu alto grau de sensibilidade a estes factores é particularmente adequado para regulação e controlo da terapêutica anticoagulante por via oral, diagnóstico de deficiências congénitas e adquiridas de factores do sistema extrínseco e controlo da actividade da síntese hepática em doenças do fígado.

Para uniformizar o controlo de doentes a fazer anticoagulação oral, o Comité Internacional para Estandarização em Hematologia (ICSH) instituiu o INR ou RNI – Razão Normalizada Internacional. O INR é a razão entre o tempo da amostra (T_a) e o de um plasma normal (T_c) elevada a um factor chamado Índice de Sensibilidade Internacional (ISI). Este ISI é uma característica da tromboplastina utilizada como reagente e é indicado pelo fabricante. Resulta da comparação da sua sensibilidade com a de uma tromboplastina padrão internacional.

$$\text{INR} = (T_a/T_c)^{\text{ISI}}$$

Assim, análises feitas em diversos laboratórios, com diversos reagentes, são comparáveis. Isto não foi ainda totalmente conseguido, pois mesmo o INR apresenta variações, mas é, sem dúvida, um grande progresso.

Tempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA)

A incubação do plasma com quantidades óptimas de fosfolípidos e um activador de superfície leva a uma activação dos factores do sistema intrínseco da coagulação. Mediante a agregação de iões de cálcio é desencadeado o processo de coagulação. Mede-se o tempo decorrido até à formação do coágulo de fibrina. A determinação do TTPA é um teste rápido para detecção de

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

transtornos do sistema intrínseco da coagulação e que detecta de modo sensível os factores VIII e IX. Usado com plasmas deficitários é um instrumento apropriado para a determinação de factores singulares do sistema intrínseco e o diagnóstico da hemofilia. Além disso pode ser utilizado para o controlo da terapia heparínica. A medição do TTPA está indicada como teste de rastreio de perturbações da coagulação especialmente antes de intervenções cirúrgicas, afim de poder submeter potenciais hemofílicos a um tratamento preventivo.

Fibrinogénio

A determinação do fibrinogénio baseia-se no método de Clauss. O plasma citratado é coagulado com uma quantidade em excesso de trombina. O tempo de coagulação depende então consideravelmente do conteúdo de fibrinogénio da amostra. Substâncias inibidoras da trombina (ex. heparina) não têm influência no resultado do teste.

Tempo de Trombina (TT)

Tempo de coagulação do plasma pela adição de trombina cálcica. Explora a transformação de fibrinogénio em fibrina. Sensível à presença de substâncias inibidoras da formação da fibrina.

D-Dímeros

Os D-Dímeros são determinados por um método imunoturbidimétrico. A determinação dos produtos de degradação da fibrina pela plasmina é um teste indirecto para o estudo da fibrinólise.

Factores da coagulação VII, VIII e IX

Utilização de um plasma que contém todos os factores excepto o que se quer dosear e que se mistura com o plasma em estudo. A quantificação do factor faz-se através de um dos testes de exploração semi-analítica (exs. factor VII – TP; factor VIII – TTPA). O resultado é dado em percentagem relativamente ao normal. Se o plasma em estudo corrige o tempo de coagulação do plasma deficiente indica que não é deficiente nesse factor.

Actividade anti-factor Xa

A actividade normal de uma molécula de factor Xa no plasma é o de clivar o seu substrato natural, a protrombina, gerando trombina, a enzima responsável pela formação do coágulo de

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

fibrina (Fibrinogénio → Fibrina). Na presença de heparina, ocorre uma competição entre este mecanismo e o mecanismo inibitório exercido pelo complexo heparina-antitrombina III, responsável pela acção anticoagulante da heparina.

O teste aqui referido é utilizado no controlo da terapêutica com heparina de baixo peso molecular e baseia-se neste princípio: O factor Xa é adicionado à mistura de plasma e substrato desencadeando duas reacções simultâneas - hidrólise do substrato pelo factor Xa e inibição do factor Xa pelo complexo heparina-antitrombina III. Após o tempo necessário para que estas reacções competitivas atinjam o equilíbrio, a quantidade de produto cromogénico libertado é inversamente proporcional à concentração de heparina presente na amostra permitindo assim a sua avaliação.

Anti-trombina III, Proteína C e S

Determinação dos inibidores da coagulação por imunoturbidimetria. O sangue circulante contém inibidores bioquímicos que previnem a amplificação da cascata da coagulação em locais fora do rolhão plaquetário.

Resistência à proteína C activada

A resistência à proteína C activada é em mais de 90% dos casos devido a uma mutação no gene do factor V. A sua determinação baseia-se num pequeno prolongamento do tempo de coagulação na presença de proteína C activada e cálcio. O prolongamento do tempo de coagulação de um plasma normal na presença de proteína C activada resulta da capacidade desta proteína para inactivar o factor Va do plasma testado. A coagulação do plasma em estudo é alcançada na presença de plasma deficiente em factor V e veneno de cobra. O veneno actua como activador do factor X, eliminando a influência de todos os outros factores da coagulação.

Plasminogénio

Determinação do plasminogénio por um método colorimétrico. Exploração do sistema fibrinolítico. Está diminuído na doença hepática e tratamentos trombolíticos.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é efectuado com dois controlos comerciais – normal e alto. No caso dos testes processados diariamente: TP, TTPA, TT, fibrinogénio e D-dímeros o controlo é efectuado duas vezes por dia. O controlo dos restantes testes é realizado apenas quando os mesmos são processados.

Agregómetro plaquetário APACT-4

O estudo da agregação plaquetária é utilizado na avaliação da função das plaquetas por diferentes vias de activação plaquetária *in vitro*. Este é um teste útil na investigação de várias patologias como a doença de von Willebrand, o síndrome de Bernard-Soulier, a trombostenia de Glanzmann, entre outras. O método baseia-se na formação de agregados de plaquetas após a sua exposição a um indutor da agregação:

- Difosfato de adenosina (ADP) 10 μ M/ml
- Ácido araquidónico 1,5mM/ml
- Colagénio 10 μ g/ml
- Ristocetina 12,5 e 0,5mg/ml

À medida que as plaquetas se agregam ocorre uma diminuição da absorvância do plasma rico em plaquetas. A taxa de diminuição é determinada por turbidimetria e depende da reactividade das plaquetas ao agonista adicionado quando outras variáveis, tais como a temperatura, a contagem de plaquetas e a velocidade de agitação estão controladas. Os resultados são monitorizados e registados numa curva de agregação plaquetária.

A causa mais frequente de alterações na função plaquetária é a ingestão de medicamentos com efeitos inibidores sobre as plaquetas, sendo o principal o ácido acetilsalicílico. Vários outros estados patológicos podem alterar a função plaquetária, tais como as doenças mieloproliferativas, urémia e doenças auto-imunes.

Resultados

Uma agregação entre 60 a 100% é considerada normal. A agregação após adição de ristocetina a 0,5mg/ml é normalmente inferior a 10%.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Resposta à agregação plaquetária:

	ADP	Ácido araquidónico	Colagénio	Ristocetina
Trombastenia	Anormal	Anormal	Anormal	Normal
Síndrome de Bernard-Soulier	Normal	Normal	Normal	Anormal
Doença de von Willebrand	Normal	Normal	Normal	Anormal
Ácido acetilsalicílico	Normal	Anormal	Anormal	Normal

Tromboelastógrafo TEG 5000

O tromboelastograma é um teste para o estudo global da coagulação a partir de uma amostra de sangue total incluindo:

- A formação do coágulo (inclui os factores da coagulação)
- A cinética do coágulo (inclui os factores da coagulação)
- A estabilidade do coágulo (inclui plaquetas e fibrinogénio)
- A dissolução do coágulo (fibrinólise)
- A avaliação da função plaquetária

O traçado gerado em forma de diapasão é a tradução gráfica da variação do estado físico que sofre o sangue ou plasma no curso da coagulação. São determinados quatro parâmetros no traçado do TEG:

Tempo R = É o período de tempo após o início do teste até à formação inicial de fibrina. Está prolongado quando há deficiência em factores, toma de anticoagulantes, hipofibrinogénemia e trombocitopénia e reduzido em caso de hipercoagulabilidade.

Tempo K = Tempo necessário para atingir um certo nível de resistência do coágulo. Está prolongado quando há deficiência de factores e reduzido na hipercoagulabilidade.

Ângulo α = Determina a formação e *cross-linking* da fibrina (coágulo estável). Está aumentado quando há hipercoagulabilidade e diminuído na hipofibrinogénemia.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Amplitude máxima = Determina a interação da fibrina com as plaquetas e representa o componente de resistência final do coágulo. Está aumentado quando há hipercoagulabilidade e diminuído quando há trombocitopénia o hipofibrinogénia.

O índice de coagulação é o resultado final obtido através de um cálculo matemático incluindo os valores obtidos para os 4 parâmetros do traçado TEG. Interpretação do índice de coagulação:

- - 3 a + 3: Normal
- < -3: Hipocoagulável
- +3: Baixo risco de hipercoagulabilidade
- + 4: Hipercoagulabilidade com tendência para trombose
- + 5: Risco elevado de trombose com necessidade de tratamento

4.2 Técnicas manuais

Factor XIII

O factor XIII activado estabiliza o coágulo de fibrina por um processo de transaminação. O coágulo estabilizado é insolúvel em ureia, pelo contrário coágulos de plasma deficiente em factor XIII são solúveis. Técnica:

1. Adicionar 200µl de plasma pobre em plaquetas a um tubo com tampa.
2. Adicionar 200µl de cloreto de cálcio.
3. Incubar o tubo durante 30 minutos a 37°C – formação do coágulo de fibrina.
4. Adicionar 3 ml de ureia e agitar.
5. Deixar o tubo *overnight* à temperatura ambiente e observar o coágulo no dia seguinte.
6. Se o factor XIII estiver presente ainda será observado o coágulo.

Produtos de degradação do fibrinogénio

Os produtos de degradação do fibrinogénio (PDF) são determinados por aglutinação directa em látex. Os PDF estão aumentados na trombose intravascular e na fibrinogénólise primária.

5. SECTOR DA IMUNO-HEMATOLOGIA

Deste grupo particular de análises são determinados os seguintes parâmetros:

- Grupo sanguíneo
- Teste de Coombs Directo
- Teste de Coombs Indirecto

5.1 Grupo sanguíneo

O grupo sanguíneo é determinado para o sistema ABO e Rh.

Sistema ABO

Existem antígenos – A, B e O - presentes na superfície dos eritrócitos contra os quais são produzidos anticorpos. Os antígenos A e B são relativamente fortes e, do ponto de vista serológico, comportam-se como genes dominantes, enquanto o antígeno O não é detectado por soros comerciais e, portanto, comporta-se serologicamente como um gene recessivo. O grupo sanguíneo O é detectado pela ausência de reacção para os antígenos A ou B, de modo que o tipo O implica a presença de antígeno O em ambos os cromossomas em lugar apenas de um. Esta situação resulta em quatro grupos fenotípicos – A, B, AB e O – visto que A e B são dominantes em relação a O. Quando os eritrócitos do indivíduo possuem antígeno A ou B, o soro contém o anticorpo contra o antígeno ausente. O antígeno O é tão fraco que, para finalidades práticas, ele é considerado não-antigénico. Portanto, um indivíduo AA ou AO terá anticorpo anti-B no soro; um indivíduo OO terá anticorpo anti-A e anti-B, e assim por diante. Ainda não está totalmente esclarecida a razão pela qual o organismo é estimulado a produzir anticorpo contra antígeno A ou B ausentes, contudo, aparentemente existem antígenos semelhantes às substâncias ABO na natureza que, de algum modo, produzem sensibilização natural.

Sistema Rh

Dos antígenos Rh o D é sem dúvida alguma, o mais antigénico, quando está presente em pelo menos um cromossoma o indivíduo é Rh positivo. O antígeno D comporta-se serologicamente como um gene dominante e os indivíduos D-positivos podem ser homozigóticos ou heterozigóticos, enquanto a ausência de reactividade D comporta-se serologicamente como gene

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

recessivo. Apenas 20 % da população são Rh negativos. Os antígenos Rh carecem de anticorpos naturais correspondentes no soro. Quando aparecem anticorpos anti Rh estes são do tipo imune e resultam da exposição de um indivíduo Rh negativo aos antígenos Rh presentes nos eritrócitos provenientes de outro indivíduo. Este processo pode ocorrer durante a gravidez ou em transfusões.

Na determinação do grupo sanguíneo para o sistema ABO é efectuada a prova directa e a prova reversa. A única excepção são os bebés com idade inferior a 6 meses em que a prova reversa não é realizada uma vez que ainda não possuem os seus anticorpos completamente desenvolvidos.

Grupo sanguíneo	Eritrócitos			Soro	
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Células A	Células B
O	-	-	-	+	+
AB	+	+	+	-	-
A	+	-	+	-	+
B	-	+	+	+	-

Método automático

A determinação automática do grupo sanguíneo é feita no aparelho Autovue Innova (Ortho Clinical Diagnostics) onde são utilizadas cassetes com seis colunas contendo reagentes diferentes:

1. Anti-A
2. Anti-B
3. Anti-D
4. Controlo
5. Células A
6. Células B

O sistema utiliza tecnologia de aglutinação em coluna com microesferas de vidro e reagente. Após a adição dos eritrócitos ou soro à coluna e subsequente centrifugação da casete, os

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

eritrócitos aglutinados são retidos nas microesferas de vidro e os não aglutinados são depositados no fundo da coluna.

Considera-se a aglutinação de glóbulos vermelhos um resultado positivo e uma indicação da presença do antigénio correspondente – formação de uma banda no topo da coluna. Considera-se a ausência de aglutinação de glóbulos vermelhos um resultado negativo e uma indicação de que não foi demonstrada a presença do antigénio correspondente – formação de um aglomerado homogéneo no fundo da coluna.

Método em tubo

O método em tubo é realizado quando a amostra é insuficiente para ser processada no aparelho ou para confirmação dos resultados.

O teste baseia-se no princípio da aglutinação directa. Os antigénios sanguíneos A, B, e D presentes à superfície dos eritrócitos, reagem com os anticorpos anti-A, anti-B, anti-AB ou anti-D presentes nos reagentes e os anticorpos Anti-A e Anti-B presentes no soro reagem com os antigénios presentes nas células reagentes, provocando uma aglutinação macroscópica.

Existem 8 possibilidades diferentes para o grupo sanguíneo:

	Anti-A	Anti-B	Anti-D
A/-	+	-	-
A/+	+	-	+
B/-	-	+	-
B/+	-	+	+
AB/-	+	+	-
AB/+	+	+	+
O/-	-	-	-
O/+	-	-	+

5.2 Teste de Coombs Directo

Fundamento

O teste de Coombs directo permite pôr em evidência os anticorpos fixados sobre glóbulos vermelhos de um indivíduo. O soro de Coombs consiste num soro que contem anticorpos antiglobulina humana, este é adicionado a uma preparação de eritrócitos após a sua lavagem, de forma a remover proteínas séricas inespecíficas. Se os eritrócitos estiverem recobertos de anticorpos, o reagente de Coombs irá atacá-los e produzir a aglutinação dos eritrócitos, formando agregados.

As principais indicações para a prova de Coombs directa incluem:

- diagnóstico da doença hemolítica do recém-nascido
- diagnóstico de anemia hemolítica em adultos (ex. anemia hemolítica autoimune adquirida idiopática ou secundária)
- pesquisa de reacções transfusionais hemolíticas

Método

O teste de Coombs directo é realizado utilizando as cassetes do sistema Ortho Biovue de forma automática no aparelho Autovue ou manualmente usando uma centrífuga especialmente concebida para o efeito. As colunas das cassetes contêm um soro poliespecífico com anticorpos anti-IgG e anticorpos contra o grupo C3d do complemento. Um teste de Coombs directo positivo indica que os eritrócitos estão cobertos *in vivo* com imunoglobulinas e/ou complemento.

Técnica manual

1. Diluir 10 µl de sangue total em 190 µl de soro fisiológico.
2. Adicionar 10 µl da diluição à microcoluna.
3. Centrifugar durante 5 minutos (centrífuga do Sistema Ortho BioVue).

5.3 Teste de Coombs Indirecto

Fundamento

O teste de Coombs indirecto permite pôr em evidência anticorpos num soro em estudo. O soro de Coombs permite revelar indirectamente por aglutinação dos glóbulos vermelhos que os transportam, os anticorpos anti-glóbulos vermelhos presentes mas não aglutinantes. Numa primeira fase eritrócitos de composição antigénica conhecida são expostos a soro contendo anticorpos desconhecidos. Se o anticorpo se combinar com os eritrócitos – o que será detectado numa segunda fase – isso prova a presença de anticorpos circulantes dirigidos contra um ou mais antigénios existentes sobre o eritrócito. A segunda fase consiste em adicionar soro de Coombs aos eritrócitos após terem sido lavados para remover proteínas ou anticorpos inespecíficos não fixados. Se o anticorpo específico tiver recoberto a superfície dos eritrócitos, o soro de Coombs irá atacá-lo e provocar a aglutinação das células. A segunda fase consiste então numa prova de Coombs directa efectuada nos produtos da primeira fase.

Uma indicação importante para a prova de Coombs indirecto ocorre na gravidez. Actualmente, está bem documentado o facto dos eritrócitos fetais atravessarem a placenta e passarem para a corrente sanguínea da mãe. Assim, a mãe Rh-negativo pode produzir anticorpos anti-Rh dirigidos contra o antigénio Rh do feto. Numa segunda gravidez a mãe com anticorpos anti-Rh IgG pode transmiti-los ao feto e dar origem à doença hereditária do recém-nascido também designada por eritroblastose fetal. A prova de Coombs é útil na detecção destes anticorpos anti-D na grávida.

Método

O teste de Coombs indirecto é realizado utilizando as cassetes do sistema Ortho Biovue de forma automática no aparelho Autovue ou manualmente usando um bloco de aquecimento e centrífuga especialmente concebidos para o efeito. As colunas das cassetes contêm um soro poliespecífico com anticorpos anti-IgG e anticorpos contra o grupo C3d do complemento. Um teste de Coombs indirecto positivo indica a presença de anticorpos irregulares no soro, sendo nestes casos necessário proceder à sua identificação utilizando um painel de células com vários antigénios e posterior titulação.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Técnica manual

1. Adicionar 50µl de soro fisiológico à microcoluna.
2. Adicionar 10µl de células O⁻ à microcoluna.
3. Adicionar 40µl de soro à microcoluna.
4. Incubar 10 minutos a 37°C (bloco de aquecimento do Sistema Ortho BioVue).
5. Centrifugar durante 5 minutos (centrífuga do Sistema Ortho BioVue).

5.4 Controlo de qualidade interno

Todos os reagentes, anticorpos e células, são testados diariamente antes do processamento das amostras pondo em evidência as suas reacções numa placa de microtitulação. As cassetes para determinação dos testes de Coombs são também testadas com células O⁻ e células sensibilizadas com IgG.

6. SECTOR DOS TESTES ESPECÍFICOS

6.1 Prova de Falciformação Experimental

Amostra

Sangue total colhido em heparinato de lítio.

A heparina actua por aumento da velocidade de acção do inibidor natural da coagulação – a antitrombina III. A sua actividade anticoagulante deve-se a uma sequência de pentassacáridos com elevada afinidade para a antitrombina III, formando-se um complexo entre estas duas moléculas. Tem a vantagem de não alterar a morfologia dos glóbulos vermelhos.

Fundamento

As hemácias falciformes aparecem no sangue periférico numa patologia hereditária designada por anemia falciforme ou drepanocitose. Esta patologia resulta de uma mutação genética numa das bases do codão do DNA – a adenina – do tripleto GAG que codifica para o ácido glutâmico. A base é substituída por um uracilo, originando o tripleto GUG que codifica para a valina. Isto passa-se na cadeia β . Como consequência surge uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina S que é solúvel quando oxigenada. Quando desoxigenada ocorre a sua cristalização sob a forma de fibras longas que vão de um lado ao outro do GV adquirindo o glóbulo a forma de foice designada por drepanócito ou célula falciforme.

Por tratamento do sangue com um redutor – metabissulfito de sódio – provoca-se a formação de células falciformes que se observam ao microscópio em tempos variáveis.

Técnica

1. Num tubo de hemólise misturar 50 μ l de sangue e 100 μ l de metabussulfito de sódio (solução extemporânea).
2. Numa lâmina de microscópio colocar uma gota da mistura e cobrir com uma lamela e selar os bordos com meio de montagem ou verniz das unhas.
3. Colocar a lâmina em câmara húmida e incubar na estufa a 37°C durante 1 hora.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

4. Observar ao microscópio o eventual aparecimento de células falciformes com objectiva de 40x.
5. Em caso negativo voltar a colocar na estufa, um resultado negativo só deve ser reportado ao fim de 12 horas de incubação.

6.2 Resistência Osmótica

Amostra

Sangue total colhido em heparinato de lítio.

Fundamento

Demonstrar o comportamento dos glóbulos vermelhos em diferentes soluções hipotónicas de cloreto de sódio. Produz-se uma hemólise quando o teor de electrólitos se encontra abaixo de um certo limiar. Quando se colocam eritrócitos numa solução isotónica de cloreto de sódio, não há troca de água entre os eritrócitos e o meio que os rodeia. Contudo, se os eritrócitos forem introduzidos numa solução hipotónica de cloreto de sódio, a diferença de osmolaridade entre o interior dos eritrócitos e o exterior, leva a que a água circundante entre para o interior dos eritrócitos. Os glóbulos vermelhos vão aumentar de volume podendo chegar à ruptura – hemólise. A prova da resistência osmótica fornece informação acerca da mudança de forma (relação superfície/volume) do eritrócito, a partir da sua forma normal de disco bicôncavo.

Técnica

1. Diluir a solução stock tamponada de NaCL a pH 7,4 (equivalente osmótico de uma solução a 10% de NaCL) 1/10.
2. A partir da solução 1 preparar soluções de concentrações de NaCL em %: 0,90 – 0,75 – 0,65 – 0,60 – 0,55 – 0,50 – 0,45 – 0,40 – 0,35 – 0,30 – 0,20 – 0,10, segundo o esquema:

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

ml de NaCl a 1%	ml de H ₂ O	Conc. do NaCl em %
9,0	1,0	0,90
7,5	2,5	0,75
6,5	3,5	0,65
6,0	4,0	0,60
5,5	4,5	0,55
5,0	5,0	0,50
4,5	5,5	0,45
4,0	6,0	0,40
3,5	6,5	0,35
3,0	7,0	0,30
2,0	8,0	0,20
1,0	9,0	0,10

3. A 4 ml de cada uma das soluções preparadas em 2, juntar 40 μ l de sangue e homogeneizar por inversão.
4. Deixar os tubos à temperatura ambiente 30 minutos.
5. Ressuspender as células e centrifugar 5 minutos a 2500 rpm.
6. Ler no espectrofotômetro a 540 nm a hemólise produzida, utilizando o tubo 0,9 como branco (0% de hemólise).
7. A absorvância lida no tubo 0,1 corresponde a 100% de hemólise.
8. Calcular a % de hemólise.
9. Traçar um gráfico pondo em ordenadas a % de hemólise e em abcissas a % de NaCl. Traçar igualmente uma curva normal.

Resultado

A fragilidade globular média refere-se a 50% de hemólise.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Aumento da fragilidade osmótica - Os esferócitos devido à menor relação superfície/volume conseguem absorver menos água do que os eritrócitos normais e hemolisam em soluções menos hipotónicas (resistência osmótica diminuída). Exemplo: Esferocitose.

Diminuição da fragilidade osmótica - Os dianócitos (*Target-cells*) e as células falciformes devido à maior relação superfície/volume conseguem absorver mais água do que os eritrócitos normais e hemolisam em soluções mais hipotónicas (resistência osmótica aumentada). Exemplo: Talassémia e drepanocitose.

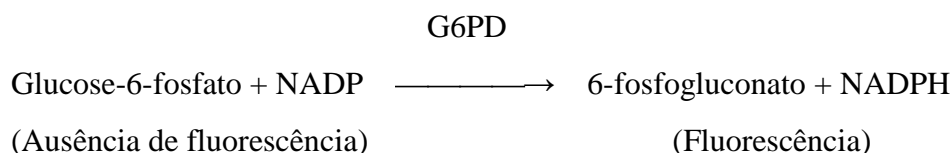
6.3 Detecção de glucose-6-fosfato desidrogenase

Fundamento

A deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma doença hereditária recessiva ligada ao sexo uma vez que o gene responsável está localizado no cromossoma X. A G6PD desempenha um papel de importância fundamental no metabolismo eritrocitário, tanto na obtenção de energia a partir da glicose quanto na sua protecção contra agentes oxidantes. Uma deficiência nesta enzima, seja porque a produção é insuficiente ou porque a enzima produzida não é funcional, desencadeia uma anemia hemolítica devido à acumulação de peróxidos tóxicos.

A maioria das pessoas com esta deficiência não apresenta sintomas, enquanto outras só desenvolvem sintomas de anemia na presença de um agente oxidante, os quais desaparecem quando a causa é removida. Só em casos raros esta patologia se manifesta como uma anemia crónica. Os agentes oxidantes envolvidos no aparecimento da anemia hemolítica podem ser medicamentos (antimaláricos, analgésicos, antibacterianos), infecções (vírus respiratório, hepatite, mononucleose infecciosa) ou a ingestão de favas.

O método de detecção da G6PD utilizado no laboratório baseia-se num teste rápido que detecta a formação de NADPH pela G6PD através da emissão de fluorescência sob luz ultravioleta. A reacção que ocorre é a seguinte:



RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Amostra

- Sangue total colhido em tubo com EDTA
- Controlo normal: sangue total colhido em tubo com EDTA de um indivíduo normal
- Controlo negativo: uma gota do reagente substrato

Técnica

1. Marcar um papel de filtro Whatman n.º 1 da seguinte forma:

AMOSTRA

CONTROLO

0 Minutos

5 Minutos

10 Minutos

Gota de reagente

2. Fazer em paralelo a amostra e o controlo normal.
3. Num tubo de hemólise adicionar 100µl do reagente com o substrato da reacção (glucose-6-fosfato, NADP e um agente lítico), juntar 5µl de amostra e homogeneizar bem.
4. Transferir uma gota para o papel de filtro na zona dos 0 minutos.
5. Colocar o tubo no banho a 37°C e registar o tempo.
6. Transferir novamente uma gota ao fim de 5 e 10 minutos para os locais respectivos no papel de filtro.
7. Deixar secar o papel de filtro durante 10-15 minutos.
8. Observar as manchas secas sob luz ultravioleta.

Resultado

Um resultado é normal quando se observa fluorescência moderada ou forte após 5 minutos e uma fluorescência forte após 10 minutos. Uma deficiência em G6PD é detectada quando não se observa fluorescência ou esta é fraca aos 5 e 10 minutos.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Limitações

Esta é uma técnica qualitativa, é recomendado que uma amostra positiva seja testada por um método quantitativo. Um resultado pode ser falsamente negativo quando existe anemia pois há poucos eritrócitos na amostra apesar da G6PD ser normal. Pelo contrário o teste pode dar um resultado normal e haver deficiência da enzima nos casos em que há reticulocitose pois os reticulócitos contêm níveis mais elevados da enzima mesmo em indivíduos com deficiência enzimática.

6.4 Titulação de aglutininas frias

Fundamento

A anemia hemolítica autoimune a aglutininas frias é uma patologia adquirida rara em que os anticorpos envolvidos são chamados de aglutininas frias, por apresentarem a máxima actividade a baixas temperaturas (0-10°C) e provocarem a aglutinação dos eritrócitos.

A maioria das pessoas possui aglutininas frias, no entanto estes autoanticorpos naturais existem em títulos baixos (<1:64 a 4°C) e não têm actividade a temperaturas mais elevadas. As aglutininas patológicas ocorrem em títulos superiores a 1:1000 – 100,000 e podem reagir a 28-31°C e por vezes até a 37°C.

As aglutininas frias, normalmente da classe IgM, combinam-se com o antígeno na superfície dos eritrócitos, formando um imunocomplexo que activa o complemento e provoca a sua hemólise. Os antígenos na superfície dos eritrócitos com os quais reagem são os antígenos I e i, a maioria dos adultos possui o antígeno I e os bebés o antígeno i. Quando a taxa de destruição excede a capacidade de recuperação da medula óssea instala-se uma anemia.

A anemia das aglutininas frias pode ser idiopática com sintomas e sinais após exposição ao frio ou o que é mais frequente surge associada a outras patologias - infecção por *Mycoplasma pneumoniae*, mononucleose infecciosa ou doenças linfoproliferativas. É mais frequente nas pessoas idosas que possuindo uma temperatura corporal mais baixa são mais susceptíveis.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

Amostra

Uma amostra de soro e uma amostra de sangue total colhido em tubo com EDTA. Para determinar a especificidade do autoanticorpo (I ou i) incluir também um sangue total de adulto e um sangue total de bebé ambos do grupo sanguíneo O.

Técnica

1. Preparar uma suspensão de células a 3% das 3 amostras de sangue total EDTA da seguinte forma: Lavar os eritrócitos por 3 vezes com soro fisiológico e juntar 90µl de células com 3000µl de soro fisiológico.
2. Marcar 1 série de tubos de plástico (11 tubos) para cada uma das amostras.
3. Adicionar 100µl de soro fisiológico a todos os tubos.
4. Adicionar 100µl de soro da amostra no primeiro tubo de cada série e agitar no vortex.
5. Diluições seriadas são feitas a partir do primeiro tubo transferindo 100µl da solução para o tubo seguinte. Após cada diluição agitar no vortex.
6. Não é adicionado soro ao tubo 11 que funciona como controlo negativo.
7. Adicionar 100µl da suspensão de células da amostra, adulto e bebé a todos os tubos respectivamente.
8. Agitar os tubos no vortex e deixar os tubos em repouso 1 hora à temperatura ambiente.
9. Ler os resultados da aglutinação macroscopicamente e registar.
10. Incubar os tubos no frigorífico a 2-8°C *overnight* (aproximadamente 12 horas).
11. Ler os resultados da aglutinação na manhã seguinte e registar.
12. Quando está presente aglutinação até ao tubo 6 e superior colocar os tubos no banho a 37°C durante 1 hora para ver se a aglutinação desaparece. Ler os resultados e registar.

Resultado

Normal < 1:64 (aglutinação até ao tubo 5).

Positivo ≥ 1:64. Quando o resultado é positivo reportar o título: tubo 1 - título 1:2; tubo 2 - título 1:4...até tubo 10 - título 1:1024 (se aglutinação positiva reportar como >1:1024).

Tubo 11: Deve ser negativo nas 3 amostras.

AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A avaliação externa da qualidade também denominada avaliação de proficiência, avaliação do desempenho ou controlo de qualidade externo, consiste na avaliação do desempenho do Laboratório de Hematologia através da análise dos resultados obtidos/emitidos nos exames de material de controlo, realizados da forma e nas condições habituais de funcionamento.

Na prática, a avaliação externa da qualidade consiste num sistema em que amostras de conteúdo conhecido mas não revelado (amostras fictícias), são introduzidas no laboratório por uma entidade externa de referência para serem examinadas exactamente da mesma forma que são examinadas na prática habitual do laboratório as amostras semelhantes dos doentes/utentes. Os resultados obtidos são depois comparados com os resultados esperados e estatisticamente tratados pela entidade organizadora.

Este Laboratório de Hematologia participa nos seguintes programas de avaliação externa da qualidade:

- *National Thistle Quality Assurance Scheme*
- *United Kingdom National External Quality Assessment Service (NEQAS)*
- *Australian Quality Assurance Scheme*

Periodicamente os resultados são avaliados e discutidos em reuniões de Serviço com os responsáveis e todos os colaboradores envolvidos, sendo estes resultados os parâmetros fundamentais para avaliação do desempenho e do funcionamento dos serviços e considerados como referências nas auditorias internas e externas do Laboratório.

CONCLUSÃO

O Estágio no Departamento de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas Ampath na África do Sul foi para mim um desafio e uma experiência muito enriquecedora tanto a nível profissional como pessoal. Durante a minha permanência pude constatar que o laboratório, acreditado de acordo com a ISO 15189:2007, processa diariamente um elevado número de amostras, possuindo grande capacidade técnica, organização e rigor.

No período em que decorreu o estágio trabalhei em todos os sectores do Laboratório, tendo tido a possibilidade de efectuar todas as técnicas interpretar e validar resultados. Algumas técnicas de Hematologia básica já tinha tido oportunidade de realizar na minha actividade anterior, no entanto, pude também contactar com técnicas novas e mais elaboradas, sobretudo na área da coagulação.

O protocolo de integração de novos colaboradores neste Laboratório inclui um período de formação e prática em cada secção, sendo realizados testes escritos (*Competency Test*) de forma a consolidar e demonstrar que os conhecimentos foram bem apreendidos, nomeadamente no que se refere ao tipo de amostra, fundamento dos métodos, equipamento utilizado, controlo de qualidade e interpretação dos resultados.

Para além destes testes o Laboratório tem também uma componente de formação contínua importante. Periodicamente são realizados testes relativos às diferentes áreas de forma a que os conhecimentos adquiridos sejam revistos e actualizados. Mensalmente é também feita a apresentação de um tema previamente definido. Durante o estágio tive oportunidade de apresentar um trabalho sobre “Aumento do CHGM nas contagens automáticas – causas e protocolos de avaliação e correcção” (em anexo).

Por tudo isto considero que o plano de Estágio referido na introdução foi cumprido e que os objectivos do estágio contidos no Regulamento dos estágios profissionalizantes do Mestrado em Análises Clínicas (Artigo 2º) foram atingidos, nomeadamente a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde, a aplicação dos conhecimentos adquiridos num

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

contexto de trabalho, a capacidade de trabalho multidisciplinar e em equipa e o contacto com os doentes aplicando princípios éticos e deontológicos.

BIBLIOGRAFIA

- Ampath (website). Disponível a partir de: <http://www.ampath.co.za/pages/home.php>.
- Bain BJ. Blood cells, a practical guide. 4ª ed. Oxford: Blackwell; 2006.
- Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. 9ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2001. cap. 4, 10 e 12.
- Duarte, A. Apontamentos da cadeira de Parasitologia Clínica, 4º Curso de Especialização de Pós-Licenciatura em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa 2003.
- Goodnight Jr SH, Hathaway WE. Disorders of hemostasis & thrombosis, a clinical guide. 2ª ed. Lancaster, PA: McGraw-Hill; 2001.
- Instruções de trabalho do Departamento de Hematologia do Laboratório Ampath, Pretória.
- Leventhal R, Cheadle RF. Parasitologia médica, texto e atlas. 4ª ed. São Paulo: Premier; 2000. p. 76-80.
- Manual de operações do ADVIA 2120 da Siemens.
- Marques, H. Apontamentos da cadeira de Hematologia I, 4º Curso de Especialização de Pós-Licenciatura em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa 2003.
- Ravel R. Laboratório clínico. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. cap. 2, 8 e 9.

ANEXOS

Increased Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

Presented by: Rita Campos

Date: 23 /10 /2009

MCHC = Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

1. Definition

This is the percentage of haemoglobin in 100 ml of red blood cells, as opposed to the percentage of haemoglobin in 100 ml of whole blood, giving the concentration of haemoglobin in the cells.

2. Calculation formula

$$\text{MCHC (g/dl)} = \text{HBG (g/dl)} / \text{HCT (\%)}$$

3. Normal range

31 – 37 g/dl

4. Possible causes of a high MCHC (> 37 g/dl)

- 4.1 Lipemic samples
- 4.2 Presence of spherocytes, rouleaux formation and auto-agglutination
- 4.3 Technical errors
- 4.4 WBC above $100 \times 10^9/l$

4.1 Lipemic samples

If the sample is lipemic the ADVIA instrument will show the flag CHCMCE. This flag is triggered if there is 1,9 g/dl difference between the calculated MCHC and the measured CHCM (mean of RBC hemoglobin concentration histogram). This can occur with lipemic samples with the CHCM giving the correct result as it is not influenced by the colorimetric HGB assay.

4.2 Spherocytes

Spherocytes are cells which are more spheroidal (i.e. less disc-like) than normal red cells but maintain a regular outline. Loss of biconcavity and progression to a sphere is seen initially by loss of “central pallor” and ultimately as a dense-staining cell which has a smaller diameter than normal – the typical microspherocyte. The degree of spherocytosis may be slight or marked and often contrasts sharply with the non-spherocytic reticulocytes that are usually present. Spherocytosis may be hereditary or acquired but whatever the aetiology microspherocytosis is due to loss of surface area (membrane) and usually results in shortened red cell survival.

Spherocytes may be seen in:

- Hereditary spherocytosis
- Auto-immune haemolytic anemia

Hereditary spherocytosis

In the hereditary form the spherocytosis develops after reticulocyte stage and is associated with abnormalities of membrane protein and lipid loss.

Laboratorial Diagnosis:

Haemoglobin N ↓

MCV N

MCHC ↑

RDW ↑↑

Reticulocytes ↑

Spherocytes in the blood smear

LDH ↑

Indirect bilirubin ↑

Osmotic fragility ↑

Electrophoresis of the membrane proteins → identify abnormal protein

Auto-immune haemolytic anemia

Acquired immune-mediated haemolytic anaemias are due to auto-antibodies to a patient's own red cell antigen. Auto-immune haemolytic anaemia (AIHA) may be idiopathic or secondary, associated mainly with lymphoproliferative disorders and autoimmune diseases, particularly systemic lupus erythematosus. AIHA may also follow atypical pneumonia

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

(*Mycoplasma pneumoniae*) or infectious mononucleosis, other viral infections and some drugs. The diagnosis of an AIHA requires evidence of anaemia, haemolysis and demonstration of auto-antibodies attached to the patient's red cells by a positive direct coombs.

The auto-antibodies associated with AIHA can be separated into two broad categories depending on how their interaction with antigen is affected by temperature, i.e. warm antibodies, which are able to combine with their corresponding red cell antigen readily at 37°C, and cold antibodies, which cannot combine with antigen at 37°C but form an increasingly stable combination with antigen as the temperature falls from 30-32°C to 2-4°C. Cases of AIHA can similarly be separated into two broad categories according to the temperature characteristics of the associated auto-antibodies – warm-type AIHA (80%) and the less frequent cold-type AIHA (20%).

The commonest type of warm auto-antibody is an IgG immunoglobulin. Cold auto-antibodies are nearly always IgM in type, in vivo, the majority do not cause haemolysis, although a minority can cause chronic intravascular haemolysis, the intensity of which is characteristically influenced by the ambient temperature.

Laboratorial Diagnosis:

Haemoglobin ↓

MCHC ↑

Spherocytes in the blood smear

Roleaux formation and auto-agglutination → cold-type AIHA

RDW ↑↑

Reticulocytes ↑

Erythroblasts ↑

LDH ↑

Indirect bilirubin ↑

Haptoglobin ↓

Osmotic fragility ↑

Direct coombs - positive

4.3 Technical errors

Examples:

- Inadequate calibration

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

- EDTA in excess of 2 mg/ml of blood may result in a significant decrease in HCT and increase in MCHC. Sample containers must contain the appropriate volume of blood. (BS4851 recommends $1,5 \pm 0,25$ mg of dipotassium EDTA per ml of blood)

Procedure on the FBC bench when the MCHC is above 37 g/dl

1. Take out the Haemoglobin, RBC, HCT, RDW and indices results from the computer system.
2. Check the specimen on the other ADVIA instrument → If the MCHC corrects enter all results from the check.
3. If the MCHC doesn't correct ask person on diff bench to look for spherocytes / auto-agglutination / rouleaux formation → Make a slide and label with requisition number and "RT" (room temperature) and also check if the specimen is lipemic → if lipemic the plasma will be turbid, dense and unclear, in this case follow procedure below "Handling lipaemic specimens".
4. Check for cold haemagglutinins → Put the EDTA tube on the waterbath @ 37°C for 30 minutes and after this period immediately check the MCHC on the ADVIA instrument:
 - If the MCHC corrects: Possible presence of cold haemagglutinins
 - If the MCHC doesn't correct: Possible presence of warm haemagglutinins or hereditary spherocytosis.
5. Make another slide after the waterbath incubation, label with the requisition number and "37°C" and give all the FBC analyser cards and slides properly identified to person on Diff bench.

N.B.

If the WBC is above $100 \times 10^9/l$ the procedure above NOT to be followed and results to be checked on the analyser and entered as is.

Handling lipaemic specimens

1. Centrifuge the EDTA tube at 3000 rpm for 3 minutes and examine the plasma macroscopically, if lipemic the plasma will be turbid, dense and unclear.
2. Remove the lipemic plasma with an automatic pipette into a clean screw cup test tube. Make sure that no red cells are removed at any stage. Close and mark with requisition number and name.
3. The precise amount of plasma removed must be replaced with saline. Do not estimate.
4. If the "plasma" is still very turbid (usually with a MCHC above 40) re-spin the specimen down, remove the "plasma" and replace with new saline.
5. Mix the specimen very well.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM HEMATOLOGIA

6. Run on manual mode on the FBC analyser.
7. The MCHC should correct. If so enter the HB, RBC, HCT, RDW and indices from this corrected count and the WBC, Differential and Platelet counts from the original card.
8. Enter the FBC comment: "Specimen is lipaemic – results may be unreliable" or canned text "HLIP".
9. Staple all FBC analyser result cards and give to Diff person.
10. If the MCHC did not correct, give all stapled FBC analyser result cards to Diff person. Make sure there is no spherocytes/ auto-agglutination/ rouleaux formation present.

Here is an example of results, which may be obtained in a lipaemic sample:

HB	21.7	falsely increased
RBC	4.93	
HCT	44.2	
MCV	89.6	
MCH	44.0	
MCHC	49.1	
RDW	13.6	
WBC	4.9	accept this count
PLT	250	accept this count

Results after the lipaemic plasma has been replaced:

HB	13.9	accept this count
RBC	4.64	accept this count
HCT	40.7	accept this count
MCV	87.7	accept this count
MCH	30.0	accept this count
MCHC	34.3	accept this count
RDW	13.7	accept this count
WBC	4.3	
PLT	49	

The HB will always be less once the plasma has been replaced

Questions

1. How is the MCHC calculated?
2. What are the possible causes for a high MCHC (> 37 g/dl)?
3. What are the most common causes for the presence of spherocytes?
4. What is necessary to check when the MCHC is above 37 g/dl?

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

OBJECTIVO

O estágio profissional na valência de Imunologia é parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório de Imunologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil sob a orientação da Dr.^a Maria Filomena Pereira Coimbra, Técnico Superior de Saúde Assistente Principal, no período compreendido entre 16 de Agosto de 2010 e 20 de Setembro de 2010 (208 horas).

O presente relatório tem como objectivo fazer uma apresentação do local de estágio e descrever a minha actividade no referido laboratório, destacando nomeadamente os parâmetros efectuados, o tipo de amostra, os equipamentos utilizados, o fundamento dos métodos, o controlo de qualidade e os aspectos mais relevantes no que diz respeito à experiência adquirida, quer do ponto de vista técnico quer do ponto de vista da sua aplicação à clínica.

INTRODUÇÃO

O Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil é a actual designação de uma organização com mais de oito décadas de tradição no tratamento de doentes oncológicos e na investigação e ensino da Oncologia. O Instituto dispõe dos meios de diagnóstico e terapêutica adequados ao cumprimento da sua missão, tanto nas áreas laboratoriais e de medicina nuclear, como nas terapêuticas cirúrgicas, médicas e pela radiação.

O Serviço de Patologia Clínica do IPO engloba cinco laboratórios - hematologia, bioquímica, imunologia, microbiologia e virologia e três áreas de suporte - gestão da qualidade, urgência e central de colheitas. O Serviço executa cerca de 100.000 análises/mês, destas 62% são requisitadas a doentes em ambulatório, 32% a doentes internados e 6 % em urgência. A produção de análises está automatizada em cerca de 75%.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

A organização do Laboratório cumpre a norma NP EN ISO 15189:2007 da prestação de serviços de Patologia Clínica, nas valências de Hematologia, Bioquímica, Microbiologia, Virologia e Imunologia, cobrindo todo o processo desde o processamento das requisições dos clínicos, passando pela recepção do utente, validação biopatológica dos resultados e sua transmissão aos Serviços Clínicos.

O Laboratório de Imunologia está inserido no Serviço de Patologia Clínica pelo que partilha organização e espaços de funcionalidade comuns, no entanto, desenvolve um conjunto de actividades específicas que de acordo com a natureza dos parâmetros e tecnologias utilizadas se organiza actualmente em quatro sectores:

1. Imunoquímica – nefelometria, electroforese, imunofixação e técnicas manuais.
2. Autoimunidade – imunofluorescência, microelisa e imunoblot.
3. Serologia – técnicas manuais, microelisa e nefelometria.
4. Marcadores tumorais – electroquimioluminiscência.

O plano de Estágio para a Valência de Imunologia foi o seguinte:

- a) Identificação do tipo de produto biológico necessário à execução de cada parâmetro.
- b) Conhecimento das condições de separação e armazenamento dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos de manipulação.
- c) Conhecimento e manipulação de reacções de precipitação, aglutinação, fixação do complemento, nefelometria, imunoenzimáticas, imunofluorescência, quimioluminiscência, imunodifusão e imunofixação.
- d) Conhecimento e manipulação dos métodos imunológicos aplicados à avaliação das patologias inflamatórias, auto-imunes, alérgicas, virais, infecciosas e oncológicas.
- e) Manuseamento, tratamento e interpretação dos resultados das amostras de controlo de qualidade interno e de avaliação externa da qualidade.

1. SECTOR DA IMUNOQUÍMICA

1.1 Nefelometria

Fundamento

A nefelometria é um método de imunoensaio que se baseia na capacidade dos complexos antigénio-anticorpo em solução formarem agregados capazes de dispersar a luz incidente. A intensidade da luz dispersa é directamente proporcional à quantidade de antigénio presente na amostra, desde que a reacção se processe na zona de excesso de anticorpo do reagente, e determinada por comparação com diluições de um padrão de concentração conhecida.

Equipamento

BN ProSpec (Siemens).

Amostras

São processadas amostras de soro, urina, LCR e outros líquidos biológicos.

Parâmetros

As proteínas determinadas neste Laboratório de Imunologia por nefelometria são as seguintes:

- Albumina
- Pré-albumina
- α 1-Antitripsina
- Haptoglobina
- Ceruloplasmina
- α 2-Macroglobulina
- α 1-Microglobulina
- Proteínas do complemento C3 e C4
- Imunoglobulinas (G, A, M, E, D)
- Cadeias leves das imunoglobulinas (totais e livres)

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Todas estas proteínas são sintetizadas no fígado excepto as imunoglobulinas e as cadeias leves livres que são produzidas pelos linfócitos B/plasmócitos da medula óssea.

Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma (40-60%), sendo responsável pela pressão oncótica. A albumina tem uma semi-vida longa (15-19 dias) pelo que diminuições significativas na concentração de albumina ocorrem lentamente caso a síntese seja subitamente reduzida. A hipoalbuminémia é uma característica da doença hepática crónica em estado avançado, no entanto, também pode ocorrer na lesão hepática aguda severa. A membrana basal do glomérulo renal não permite normalmente a passagem de albumina, apenas uma pequena quantidade de albumina (< 30mg/24h) pode ser encontrada na urina pelo que a albuminúria é um marcador de lesão glomerular.

A albumina é determinada no soro, urina, LCR, líquido ascítico e líquido pleural. A concentração de albumina no LCR e a determinação do quociente albumínico LCR/soro são um componente importante para a avaliação da integridade da barreira hemato-encefálica e da síntese intratecal de imunoglobulinas. A albumina no líquido ascítico e pleural é determinada para diferenciar um exsudado de transudado.

Pré-albumina

A pré-albumina é uma glicoproteína que tem como função o transporte das hormonas tiroideias e da proteína que transporta o retinol (rbp). O seu tempo de semi-vida é curto, aproximadamente 2 dias, sendo por isso considerada um bom marcador nutricional com uma sensibilidade mais elevada do que a albumina e a transferrina. O doseamento da pré-albumina no soro é utilizado no controlo do estado nutricional e da eficácia da nutrição parental.

α 1- Antitripsina

A α 1-antitripsina é uma glicoproteína que migra na região α 1 da electroforese do soro, representando cerca de 90% desta fracção. É uma proteína de fase aguda com actividade anti-proteásica. A sua principal função é a de neutralizar as enzimas (elastase e colagenase) libertadas pelos neutrófilos. A concentração plasmática da α 1-antitripsina está diminuída na deficiência

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

congénita e em patologias associadas com grandes perdas de proteínas. A sua deficiência está associada a doença pulmonar (enfisema) e hepática (cirrose hepática juvenil). Valores aumentados no soro são mais comuns uma vez que é uma proteína de fase aguda, aumentando em situações inflamatórias ou de lesão tecidual.

Haptoglobina

A haptoglobina é uma glicoproteína que migra na região α_2 da electroforese do soro e tem como função o transporte da oxihemoglobina livre no plasma, impedindo a perda de hemoglobina e ferro na urina. O complexo haptoglobina-hemoglobina é removido pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial, onde os componentes da hemoglobina são metabolizados em aminoácidos e ferro.

Concentrações baixas de haptoglobina no soro ocorrem em situações de hemólise intravascular por consumo. A haptoglobina é uma proteína de fase aguda por isso encontra-se aumentada nos estados inflamatórios, outras causas de aumento desta proteína são a gravidez e a toma de anticoncepcionais orais, pois os estrogénios estimulam a sua síntese.

Ceruloplasmina

A Ceruloplasmina é uma α_2 -glicoproteína que tem como função o transporte do cobre. É uma proteína de fase aguda positiva com propriedades antioxidantes, pelo que os seus valores estão aumentados em situações inflamatórias ou de lesão tecidual. A gravidez e os anticoncepcionais orais também aumentam a sua síntese. A sua concentração no soro é baixa na doença de Wilson, doença congénita hereditária com acumulação de cobre no tecido hepático, núcleo lenticular da base do crânio e periferia da córnea.

α_2 -Macroglobulina

A α_2 -macroglobulina é uma das maiores proteínas plasmáticas, segunda maior a seguir à IgM, que tem como função a inibição de proteases, embora de forma mais inespecífica do que a α_1 -antitripsina. A determinação da concentração no soro da α_2 -macroglobulina tem um interesse clínico limitado. No síndrome nefrótico em que ocorre perda de proteínas a α_2 -macroglobulina é retida devido ao seu elevado peso molecular, ficando então aumentada no soro. Valores elevados

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

também ocorrem na gravidez e na toma de anticoncepcionais orais. Concentrações baixas podem ocorrer na pancreatite aguda por ligação às enzimas proteolíticas. Neste Laboratório de Imunologia a α 2-macroglobulina é apenas doseada na urina de 24 horas para detecção de uma lesão com hemorragia pós-renal.

α 1-microglobulina

A α 1-microglobulina é uma glicoproteína de baixo peso molecular que é filtrada pelo glomérulo renal sendo posteriormente reabsorvida pelos túbulos proximais dos nefrónios. O aumento da concentração urinária desta proteína é um indicador sensível de lesão das células tubulares renais.

Proteínas do complemento C3 e C4

O complemento tem um papel importante na resposta imunitária. Este é constituído por várias proteínas que circulam no plasma no estado inactivo. Sobre a influência de diversos factores sofrem uma activação em cadeia. A activação do complemento permite a destruição de antigénios particulares, quer directamente por ligação ao imunocomplexo, quer através da activação da fagocitose e o início de fenómenos de recrutamento e de cooperação das células inflamatórias.

A activação pode fazer-se pela via clássica estimulada pelos complexos antígeno-anticorpo (reconhecimento específico do alvo) e pode também fazer-se pela via alterna, activada pelos polissacáridos microbianos, na ausência dos anticorpos (reconhecimento não específico do alvo). As duas vias desencadeiam a clivagem do componente C3 e a formação de um complexo terminal ou lítico. O C3 situa-se num cruzamento e é o componente mais abundante no soro.

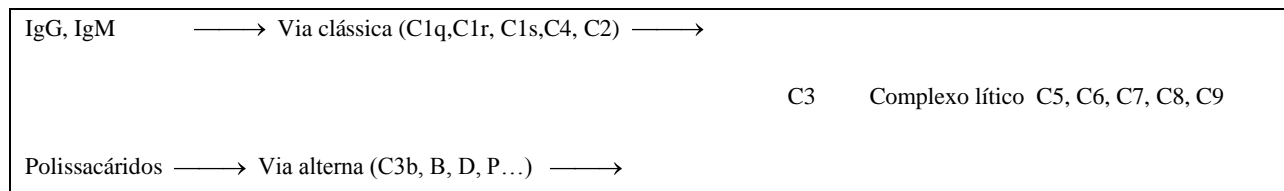


Figura 1. Via clássica e via alterna do complemento (Caquet R. Guia prático de análises clínicas. 1ª ed. Lisboa: Climepsi; 2004).

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

A via alterna constitui uma primeira linha de defesa, enfrentando directamente as bactérias, sendo eficaz em alguns minutos, bem antes do aparecimento dos anticorpos. A via clássica permite aos anticorpos fixados sobre a membrana celular activar o complemento e desencadear a citólise e a fagocitose. A activação do complemento é controlada por vários inibidores, entre os quais se encontra o inibidor de C1.

As situações de diminuição do complemento sugerem a presença de estimulação anómala deste complexo com consumo excessivo dos factores. A hipocomplementémia ocorre em anemias hemolíticas auto-ímmunes, glomerulonefrites (exs. pós-estreptocócica, lúpica), défices hereditários (ex. angioedema hereditário – défice do inibidor de C1). A hipercomplementémia surge no seguimento de situações inflamatórias do mesmo modo que o aumento da velocidade de sedimentação e das proteínas de fase aguda.

Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são proteínas produzidas pelos linfócitos B/plasmócitos da medula óssea como parte da resposta imune. Os plasmócitos são os linfócitos B diferenciados após a exposição a um antígeno estranho (ou ocasionalmente endógeno).

As imunoglobulinas são proteínas que possuem a mesma estrutura básica - duas cadeias peptídicas leves e duas cadeias peptídicas pesadas, que estão ligadas entre si por pontes bissulfídricas. As cadeias leves podem ser de dois tipos: kappa ou lambda. As cadeias pesadas podem ser de cinco tipos: alfa, gama, delta, epsilon e mu. As imunoglobulinas são classificadas de acordo com o tipo de cadeia pesada em cinco classes: IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. A classe IgG tem caracterizadas quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 que correspondem às quatro cadeias pesadas gama 1, gama 2, gama 3 e gama 4 respectivamente. Para a classe IgA estão caracterizadas duas subclasses: IgA1, IgA2, caracterizadas por cadeias pesadas alfa 1 e alfa 2 respectivamente.

Na molécula de imunoglobulina são referenciadas duas regiões funcionais: a extremidade Fab, ou variável, é a região que reconhece e que se liga ao antígeno e a extremidade Fc, constante, que é responsável pela interacção com outros componentes do sistema imune designadamente o

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

complemento e as células CD4+. As várias classes de imunoglobulinas possuem estruturas terciárias e funções diferentes (tabela 1). Os principais anticorpos do plasma são IgG, IgA e IgM (IgG +/- 80%).

Tabela 1 – Classes de imunoglobulinas (Caquet R. Guia prático de análises clínicas. 1ª ed. Lisboa: Climepsi; 2004).

Imunoglobulina	Estrutura	Função
IgG	Monómero	Neutraliza toxinas, activa o complemento, antimicrobiano
IgA	Dímero/monómero/trímero/forma secretória	Antimicrobiano
IgM	Pentâmero	A primeira a ser produzida na resposta imune primária, activa o complemento
IgD	Monómero	Receptor de antígeno da superfície celular
IgE	Monómero	Anti-alérgico, anti-parasitário

As imunoglobulinas são detectadas na fracção gama da electroforese das proteínas do soro. A electroforese pode mostrar nesta fracção deficiências, excessos ou a presença de uma banda monoclonal. A quantificação das imunoglobulinas por nefelometria impõem-se sempre que na electroforese é referenciada qualquer alteração na fracção gama.

As imunoglobulinas podem estar aumentadas de forma não específica numa grande variedade de infecções e nas doenças auto-imunes. Este aumento da síntese tem origem em várias linhagens celulares, cada uma produzindo a sua imunoglobulina específica. Diz-se então que a resposta é policlonal e produz um aumento difuso da massa de proteína em toda a região das gama globulinas na electroforese. Em contraste, as células de um clone único produzem anticorpos idênticos. À medida que as células se multiplicam, a produção de imunoglobulinas torna-se suficientemente grande para que possa ser observada na electroforese como uma banda única monoclonal.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

A presença de um componente monoclonal pode corresponder a uma situação benigna ou maligna. No mieloma múltiplo, situação maligna caracterizada por dores e lesões ósseas e uma infiltração plasmocitária da medula óssea, a electroforese de proteínas detecta a presença de um componente monoclonal, o doseamento de imunoglobulinas quantifica esse componente e avalia a diminuição das restantes classes de imunoglobulinas. A imunofixação caracteriza a imunoglobulina monoclonal. O componente monoclonal pode pertencer a qualquer uma das classes de imunoglobulinas, contudo na maioria dos casos pertence à classe IgG (cerca de 75%). Em cerca de 95% dos casos de mieloma, as cadeias leves monoclonais são produzidas em maior quantidade do que as cadeias pesadas. Em 15% dos casos somente são produzidas cadeias leves (mieloma a cadeias leves). As cadeias leves livres são suficientemente pequenas para passar o glomérulo e aparecer na urina, onde são designadas por proteínas de Bence Jones.

Nas formas benignas - gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) a concentração do componente monoclonal não está tão elevada como no mieloma e as outras imunoglobulinas estão normais ou pouco diminuídas. Na maioria dos casos não há proteinúria de Bence Jones (a sua presença parece estar associada a situações de mau prognóstico – evolução posterior para malignidade). Por este facto estes doentes requerem acompanhamento cuidadoso e regular.

As deficiências ou a ausência de imunoglobulinas podem ocorrer como consequência de defeitos genéticos (imunodeficiências congénitas) ou adquiridos (infecções, terapêutica imunossupressora, doenças malignas).

Neste Laboratório de Imunologia são determinadas no soro as imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE e as quatro subclasses de IgG. A IgG, IgA e IgM são também doseadas no LCR para avaliação da síntese intratecal de imunoglobulinas e a IgG é doseada na urina no estudo da proteinúria.

Cadeias leves das imunoglobulinas

As cadeias leves podem ser de dois tipos: kappa ou lambda. No homem são produzidas aproximadamente duas vezes mais cadeias leves κ do que cadeias λ (2:1). Situações de

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

hipergamaglobulinémia policlonal cursam com o aumento da concentração das cadeias leves, no entanto, a razão κ/λ permanece normal nestas situações. O aumento da produção de imunoglobulinas completas ou de cadeias leves livres monoclonais, altera a relação das cadeias leves. Uma razão κ/λ significativamente alterada é em regra geral devido a uma patologia plasmoproliferativa (ou linfoproliferativa) que secreta cadeias leves em excesso e perturba o seu balanço normal. O doseamento das cadeias leves das imunoglobulinas totais e livres é efectuado no soro.

1.2 Electroforese

Electroforese das proteínas séricas

Fundamento

A electroforese é uma técnica que permite a separação e quantificação das fracções proteicas. A electroforese das proteínas baseia-se nas propriedades eléctricas das fracções proteicas que lhes permite migrar diferentemente sob a acção de um campo eléctrico, quando colocadas num suporte próprio. As proteínas são portadoras de cargas eléctricas e devido à sua composição ($\text{NH}_3^+ - \text{R} - \text{COO}^-$) pela acção da corrente eléctrica aplicada em determinadas condições e dado serem moléculas anfotéricas, adquirem assim, uma carga global negativa migrando do cátodo para o ânodo cindindo-se em várias fracções correspondentes a diferentes proteínas. As cargas negativas decrescentes fazem-se pela seguinte ordem: albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gama globulinas. Observando a partir do ponto de aplicação do soro verifica-se que a albumina é a proteína que migra mais e que as gamaglobulinas pouco se deslocam. Isto explica-se pela velocidade de migração de cada uma das fracções que depende do peso molecular e da mobilidade electroforética das fracções. As proteínas com maior representatividade nas diferentes fracções são as seguintes:

- Albumina
- Fracção $\alpha 1$ – $\alpha 1$ -antitripsina, $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, $\alpha 1$ -fetoproteína e HDL.
- Fracção $\alpha 2$ – $\alpha 2$ -macroglobulina, haptoglobina e ceruloplasmina.
- Fracção β – transferrina, ferritina, proteínas do complemento C3 e C4, LDL.
- Fracção γ – imunoglobulinas e proteína C reactiva.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Equipamento e reagentes

- Aplicador de amostras automático – Hydraplus (Sebia)
- Aparelho de electroforeses semi-automático – Hydrasis (Sebia)
- Densitómetro/scanner acoplado com *software* Phoresis (Sebia)

A electroforese é realizada em gel de agarose. O tampão utilizado tem um pH alcalino (pH=9,2). As proteínas adquirem carga negativa e por acção do campo eléctrico migram para o ânodo. A seguir, uma solução corante de negro de amido vai fixar-se às fracções migradas. Por passagens numa solução descorante o excesso de corante é removido. Após a secagem do gel a quantificação relativa em percentagem das fracções proteicas é feita por densitometria.

Electroforese das hemoglobinas

Fundamento

A electroforese das hemoglobinas permite detectar as principais hemoglobinopatias - patologias genéticas da hemoglobina. As hemoglobinopatias incluem as anomalias qualitativas, as quais são identificadas através da detecção das variantes da hemoglobina (exs. HbS, HbC, HbE e HbD) e as anomalias quantitativas (talassémias) que apresentam alterações quantitativas das hemoglobinas normais.

O padrão electroforético de um adulto normal apresenta apenas as hemoglobinas HbA1 (posição anódica), HbA2 (posição catódica) e a HbF. A HbA1 é a mais abundante e constitui a fracção predominante (96-99%). A HbA2 representa uma pequena fracção ($\leq 3,5\%$), tal como a HbF (<2%).

Equipamento e reagentes

A electroforese das hemoglobinas é efectuada no aparelho de electroforeses semi-automático Hydrasis (Sebia). A electroforese é realizada a partir do hemolisado dos eritrócitos em gel de agarose e em meio alcalino (pH 8,5). A pH alcalino a hemoglobina apresenta carga negativa e migra para o ânodo. A posterior coloração com negro de amido permite visualizar as fracções de hemoglobina presentes na amostra, as quais são identificadas por comparação com um padrão de referência contendo HbA1, HbF, HbC e HbS.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Interpretação

As anomalias qualitativas resultam de alterações estruturais na molécula de hemoglobina, normalmente devido a uma mutação pontual que leva à substituição de um aminoácido por outro nas cadeias globínicas. A variante mais comum é a HbS, a qual resulta da substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia β . A HbS apresenta uma diminuição da sua mobilidade electroforética, migrando numa posição central entre as fracções A1 e A2.

A HbC é a segunda variante da hemoglobina mais comum. A substituição do ácido glutâmico pela lisina na posição 6 da cadeia β resulta numa molécula de hemoglobina carregada positivamente, a sua mobilidade electroforética está muito diminuída e a sua migração é sobreposta com a HbA2. Quando a fracção da HbA2 é superior a 15% deve-se suspeitar da presença de HbC, pois valores altos de HbA2 não são compatíveis com a vida.

A HbE resulta da substituição do ácido glutâmico pela lisina na posição 26 da cadeia β e a sua migração é também sobreponível com a HbA2 e HbC. Na electroforese em meio ácido não se separa da HbA1 e HbA2 o que permite a sua diferenciação. A HbD resulta da substituição do ácido glutâmico pela glutamina na cadeia β e possui uma mobilidade idêntica à HbS, mas ao contrário da HbS, não se separa da HbA1 e HbA2 em meio ácido, em alternativa pode ser realizada uma prova de falciformação experimental para fazer a distinção.

As talassémias são um grupo heterogéneo de distúrbios genéticos caracterizados pela diminuição da síntese de uma das cadeias de globina. Para compensar este défice existe um aumento da síntese de outras cadeias para se formar o tetrâmero. As β -talassémias caracterizam-se pela diminuição da síntese de cadeias β afectando, conseqüentemente, a síntese da HbA1. A HbA2 está aumentada podendo ocorrer o mesmo com a HbF. Nas α -talassémias há uma diminuição da síntese de cadeias α . A hemoglobina de Bart (forma embrionária) corresponde a um tetrâmero de cadeias γ e é incompatível com a vida. A hemoglobina H corresponde a um tetrâmero de cadeias β .

1.3 Imunofixação

Imunofixação

A imunofixação é um teste para a detecção e identificação de proteínas monoclonais no soro e urina. O princípio da imunofixação baseia-se na visualização de proteínas específicas através da formação de complexos antígeno-anticorpo depois de efectuada a separação das proteínas por electroforese. O teste permite a separação electroforética de proteínas num gel de agarose tamponado. Após a electroforese, o antisoro monoespecífico (anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-kappa e anti-lambda) é depositado directamente sobre a superfície do gel, ao longo do eixo de migração electroforética, para que ocorra a formação do imunocomplexo. Os complexos de antígeno-anticorpo resultantes são detidos na estrutura porosa do gel. Paralelamente deve utilizar-se um anti-soro poliespecífico de forma a produzir um padrão de referência electroforético de proteínas. O gel é então processado para remover o excesso de proteínas solúveis, seco e corado com um corante específico para proteínas (violeta ácido), para revelar as bandas de imunoglobulinas e o padrão de referência. A interpretação é feita através da observação visual das bandas coradas.

A imunofixação produzirá bandas a partir de antisoros específicos para a identificação de proteínas humanas IgG, IgA e IgM e/ou cadeias kappa (livres e ligadas), e/ou cadeias lambda (livres e ligadas). Posteriormente e dependendo dos resultados iniciais podem ser testados os antisoros anti-IgD e anti-IgE e anti-cadeias leves livres κ e λ . Uma amostra normal produzirá uma coloração de fundo leve e difusa sem formação de bandas severas ou produzirá um fundo límpido e sem coloração. Uma reacção policlonal produz um fundo de coloração difusa sem formação de bandas severas.

Pesquisa de proteína de Bence Jones

A proteína de Bence Jones é sinónimo de cadeias leves livres. Nas discrasias plasmocitárias o clone de plasmócitos neoplásicos pode produzir cadeias leves livres em grande quantidade. Estas proteínas de baixo peso molecular têm uma semi-vida curta de 2-6 horas sendo rapidamente filtradas pelo glomérulo renal e posteriormente reabsorvidas pelos túbulos proximais dos nefrónios, só aparecendo na urina quando a sua quantidade está muito aumentada de forma a saturar os mecanismos de reabsorção.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

A pesquisa da proteína de Bence Jones é feita na urina e no soro (ex. mieloma múltiplo a cadeias leves). A metodologia é idêntica à imunofixação diferindo apenas nos antisoros aplicados. Os antisoros utilizados são: antisoro trivalente anti-cadeias pesadas IgG, IgA e IgM, anti-cadeias leves κ e λ conjugadas e anti-cadeias leves livres κ e λ .

1.4 Estudo das proteínas urinárias

A excreção fisiológica de proteínas é normalmente inferior a 0,15g/24 horas e deve-se essencialmente à presença de albumina. Uma concentração superior indica normalmente um processo patológico sendo necessário determinar o tipo de proteínas de forma a determinar a causa da proteinúria.

A proteinúria glomerular é a forma mais comum. Dependendo da extensão da lesão glomerular, as proteínas são filtradas e aparecem na urina. Quando o peso molecular determina o tipo de proteínas que surgem na urina esta é designada de proteinúria glomerular selectiva devendo-se normalmente à presença de albumina. Quando a lesão se torna progressivamente mais grave a selectividade da filtração diminui e proteínas de vários pesos moleculares passam através da membrana glomerular, sendo este tipo de proteinúria designado por proteinúria glomerular não selectiva. A proteinúria glomerular surge em várias nefropatias tais como a nefropatia diabética, amiloidose, LES, síndrome nefrótica, etc.

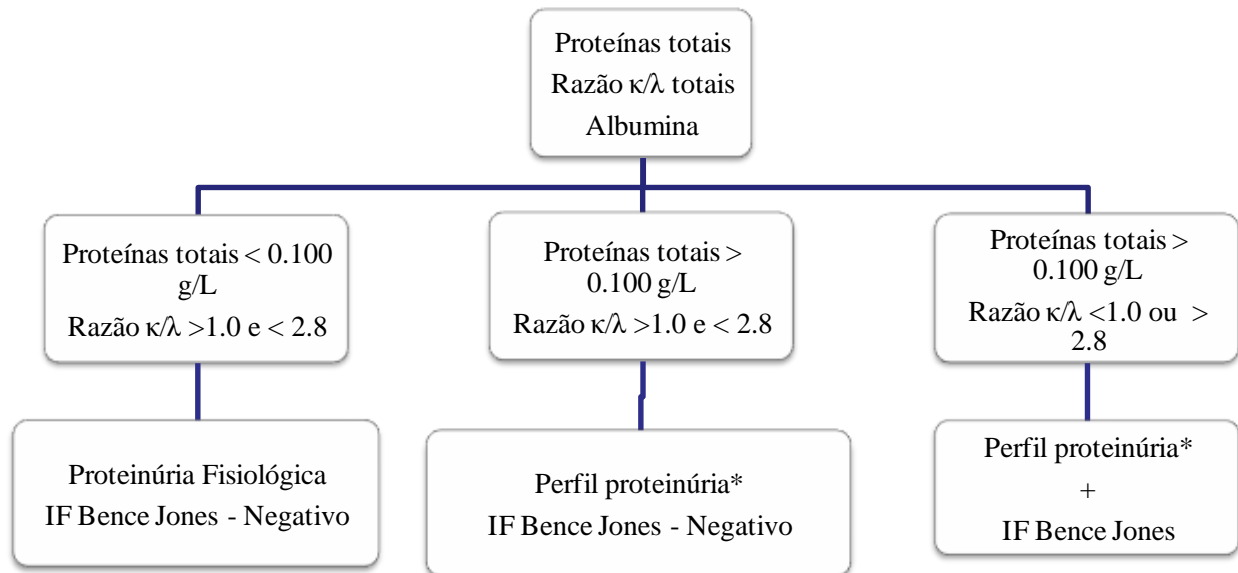
A proteinúria tubular é menos frequente e é caracterizada pelo aparecimento de proteínas de baixo peso molecular na urina, devendo-se este facto a um defeito na sua reabsorção ao nível dos túbulos proximais. As proteínas tipicamente excretadas são a α 1-microglobulina, a β 2-microglobulina e a lisozima. A proteinúria tubular aguda é reversível e ocorre em distúrbios metabólicos congénitos, infecções, administração de fármacos nefrotóxicos e pancreatite aguda. A proteinúria tubular crónica é normalmente irreversível e ocorre na acidose tubular renal e no síndrome de Fanconi.

Outra causa de proteinúria deve-se ao aumento da produção de proteínas filtradas (baixo peso molecular) e consequente incapacidade de reabsorção por se ter excedido o limiar de reabsorção tubular (proteinúria pré-renal). Surge em várias patologias como as doenças linfoproliferativas

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

(excreção de β 2-microglobulina), mieloma múltiplo e outras discrasias plasmocitárias (excreção de cadeias leves livres), rabdomiólise (excreção de mioglobina), etc.

Algoritmo para o estudo da proteinúria



* Perfil proteinúria:

- Marcadores de lesão glomerular: albumina e IgG
- Marcador de lesão tubular: α 1-microglobulina
- Marcador de lesão pós-renal: α 2-macroglobulina
- Creatinúria e creatinemia
- Urina tipo II

1.5 Estudo das proteínas do LCR

A maioria das proteínas do LCR (80%) provém do plasma por ultrafiltração e as restantes são sintetizadas *de novo* pelas células dos plexos coróides. As proteínas predominantes são as de baixo peso molecular tais como a pré-albumina, albumina, transferrina e imunoglobulinas da classe IgG.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

A elevação das proteínas no LCR, apesar de ser um parâmetro inespecífico, pode indicar uma ruptura da barreira hemato-encefálica (BHE) ou a síntese intratecal de imunoglobulinas ou ambas. A alteração da permeabilidade da BHE ocorre por exemplo na meningite, encefalite, tumor cerebral e hemorragia intracraniana. A síntese intratecal de imunoglobulinas ocorre em doenças do sistema nervoso central (SNC) como a esclerose múltipla, neurosífilis, linfoma, etc.

Para verificar se os níveis elevados de imunoglobulina IgG, IgA ou IgM se devem à sua produção intratecal ou ao aumento dos níveis séricos, efectua-se o doseamento das imunoglobulinas e da albumina por nefelometria no soro e no LCR e calcula-se a relação imunoglobulina/albumina e o índice de imunoglobulina. Como a albumina não é produzida no SNC, valores elevados de imunoglobulina e albumina indicam lesão da BHE e a razão entre ambas será semelhante à do LCR normal. Pelo contrário, se houver produção intratecal a razão imunoglobulina/albumina está aumentada.

Imunofixação do LCR

A demonstração da síntese intratecal de imunoglobulinas é muito importante no diagnóstico das doenças desmielinizantes do SNC, especialmente a esclerose múltipla. A presença de bandas oligoclonais na imunofixação do LCR é observada em mais de 90% dos casos de esclerose múltipla. Na maioria dos casos as imunoglobulinas são da classe IgG, muito raramente são da classe IgA ou IgM. Estas bandas são formadas por imunoglobulinas sintetizadas por um ou poucos clones de plasmócitos em resposta à presença contínua de um antígeno único e altamente específico.

A imunofixação do LCR tem como objectivo a pesquisa de um perfil oligoclonal específico das imunoglobulinas. São analisados em paralelo o soro e o LCR do doente colhidos na mesma altura de forma a comparar o perfil das imunoglobulinas. Inicialmente faz-se a separação electroforética das proteínas em gel de agarose de alta resolução e posteriormente a imunofixação das proteínas com antisoro anti-IgG (e eventualmente anti-IgA, anti-IgM).

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

A imunofixação é mais específica e mais sensível na detecção da síntese intratecal de imunoglobulinas do que a informação proporcionada pelos vários cálculos determinados a partir das concentrações totais das imunoglobulinas e das proteínas do soro e do LCR. A observação de um perfil diferente de imunoglobulinas entre o soro e o LCR do mesmo doente ou a presença de bandas suplementares monoclonais ou oligoclonais no LCR, permite concluir que houve síntese intratecal de imunoglobulinas.

1.6 Pesquisa de crioglobulinas

As crioglobulinas são paraproteínas presentes no soro que se caracterizam por precipitarem a temperaturas inferiores à temperatura corporal. Podem ser complexos de imunoglobulinas policlonais, em cerca de 50% dos casos são monoclonais, geralmente da classe IgM.

Técnica

1. Fazer a colheita de sangue para um tubo seco previamente aquecido a 37°C e deixar coagular na estufa a 37°C.
2. Centrifugar o tubo e separar o soro para 2 tubos de vidro transparentes.
3. Tapar os tubos com parafilme.
4. Colocar um tubo a 4°C (tubo teste) e outro na estufa a 37°C (tubo controlo negativo).
5. Observação diária do tubo.
6. Resultado:
 - > Resultado positivo - formação de um retículo macroscópico.
 - > Resultado negativo - ausência de formação do retículo macroscópico ao fim de 7 dias.

2. SECTOR DA AUTOIMUNIDADE

É um conceito aceite que o sistema imunitário tem a capacidade de distinguir o *self* do não *self*, e que só uma anomalia do sistema podia originar uma resposta auto-imune. De facto, a tolerância ao *self* é uma noção bem estabelecida. A teoria da deleção clonal considera que durante o desenvolvimento de um linfócito, ele circula e é exposto a antígenos ubíquios do *self*. Se o linfócito tem a capacidade de reagir com o *self* está programado para sofrer apoptose (morte celular programada).

Graças aos avanços da imunologia tem sido demonstrado que auto-anticorpos autoreactivos não são necessariamente destrutivos mas pelo contrário são parte integrante do funcionamento do sistema imunitário, envolvido na cura de lesões, limpando os restos celulares, as células envelhecidas, etc.. Estas respostas auto-reactivas “naturais” são contudo transitórias na natureza e predominantemente de isotipo IgM. Uma produção incontrolada de auto-anticorpos poderá resultar numa doença auto-imune.

2.1 Fundamento dos métodos

Imunofluorescência Indirecta (IFI)

Método utilizado para detecção e semi-quantificação de auto-anticorpos no soro. Trata-se de um procedimento que utiliza anticorpos fluorescentes como marcadores para uma reacção de ligação antígeno-anticorpo. Na amostra em estudo os auto-anticorpos eventualmente presentes fixam-se aos antígenos do substrato. O anti-soro polivalente conjugado com fluoresceína adicionado ao substrato fixa-se ao anticorpo ligado. Depois da lavagem para remover o conjugado em excesso, o substrato é observado ao microscópio de fluorescência.

A IFI é a técnica com que se inicia a pesquisa da maior parte dos auto-anticorpos. Apresenta como vantagens a fácil execução, a elevada sensibilidade e a possibilidade de detecção simultânea de mais do que um auto-anticorpo. Apresenta no entanto importantes limitações

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

metodológicas e de interpretação, é uma técnica subjectiva, difícil de padronizar e os resultados são semi-quantitativos.

A escolha do substrato depende do tipo de anticorpo que se pretende pesquisar. Os substratos utilizados são os seguintes:

Células HEp-2

As células HEp-2 são células epiteliais humanas obtidas de carcinoma da laringe (*human epithelioma type 2 cells*). Estas células são utilizadas na pesquisa dos anticorpos antinucleares (ANA) e têm como vantagens o facto de possuírem um núcleo grande, grandes e vários nucléolos, grande diversidade de antígenos nucleares, elevada sensibilidade e especificidade e várias células nos diferentes estadios de mitose permitindo a detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos que apenas são expressos durante o ciclo celular.

Os ANA constituem um vasto grupo de auto-anticorpos que reagem com diversos constituintes do núcleo: dsDNA, histonas, nucleossoma, antígenos nucleares extraíveis (ENA) – Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Jo-1 e Scl70, nucléolo, membrana nuclear e aparelho mitótico (centrómero, centríolo e fuso mitótico). O método tradicional para *screening* dos ANA no soro tem sido desde há muito o método de imunofluorescência indirecta, sendo as abordagens posteriores, no que respeita a técnicas e caracterização dos anticorpos, resultantes do padrão de fluorescência obtido.

A identificação das especificidades dos ANA em doentes com doenças sistémicas de base auto-imunitária, tais como o lúpus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, síndrome de Sjogren (SS), polimiosite (PM), dermatomiosite (DM), doença conectiva mista do tecido conjuntivo (MCTD) artrite reumatóide (AR) e outras, tem grande importância fisiopatológica e clínica. De facto, algumas especificidades dos ANA contribuem para o diagnóstico e podem ser utilizadas no estudo da evolução natural da doença, na monitorização terapêutica e ainda no estabelecimento do prognóstico.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Tabela 2 – Padrões nucleares comuns e correlação com a clínica (Biorad. Autoimmune CD, education and training tools [CD-ROM]. 2009).

Padrão nuclear	Características	Correlação clínica
Homogêneo	Fluorescência difusa e uniforme dos núcleos em interfase, mitoses positivas	LES, lúpus induzido por fármacos, AR
Mosqueado	Fluorescência granular fina ou grosseira dos núcleos em interfase, mitoses negativas	LES, MCTD, SS, PM, esclerodermia
Centrómero	Numerosos pontos fluorescentes (46), mitoses positivas	CREST, cirrose biliar 1 ^a
Nucleolar	Coloração exclusiva dos nucléolos, mitoses positivas ou negativas	Esclerodermia, miosite, LES

Em muitas circunstâncias são os perfis de tipos distintos de ANA que estão associados a certas doenças, sendo considerados marcadores para algumas delas. A título de exemplos, o anticorpo contra o antígeno Smith (Sm) e o anticorpo anti-dsDNA têm uma forte associação com o LES, enquanto que o ANA anti-centrómero está associado, frequentemente, a uma forma particular de esclerodermia – CREST: síndrome com calcinose, fenômeno de Raynaud, disfunção esofágica, esclerodactilia, telangiectasias.

Tabela 3 – Correlação de alguns ENA com a clínica (Biorad. Autoimmune CD, education and training tools [CD-ROM]. 2009).

Anticorpo	Correlação clínica
Anti Sm	LES
Anti RNP	MCTD, LES, miosite, esclerodermia,
Anti SSA	SS, LES, lúpus neo-natal
Anti SSB	SS, LES
Anti Jo-1	PM/DM
Anti SCI70	Esclerodermia

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Crithidia luciliae

Este substrato é utilizado na pesquisa de anticorpos anti-dsDNA. A *Crithidia luciliae* é um parasita flagelado, não patogénico para o Homem, que possui uma mitocôndria gigante que contém uma massa de dsDNA circular muito condensada. Esta massa de DNA, conhecida como o cinetoplasto, parece ser livre de histonas ou de quaisquer outros antigénios nucleares de mamíferos. A principal vantagem do teste de dsDNA usando a *Crithidia luciliae* é a sua grande especificidade, devido à natureza do dsDNA circular no cinetoplasto.

Substrato triplo (rim, estômago e fígado de roedores)

A imunofluorescência indirecta sobre cortes de tecidos de rim, estômago e fígado de roedores é o método utilizado na pesquisa dos anticorpos anti-mitocôndria (AMA), anticorpos anti-célula parietal (APCA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA) e anticorpos anti-microsomas hepáticos e renais (anti-LKM). Os diferentes anticorpos são identificados de acordo com o aspecto e localização da fluorescência ao nível dos três tecidos.

Células VSM47

As células VSM47 são células musculares lisas (*vascular smooth muscle*) utilizadas na pesquisa de anticorpos anti-filamentos de actina (F-actina), por exemplo no caso de um ASMA positivo.

Granulócitos

As preparações de granulócitos humanos são utilizadas na pesquisa dos anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA). As preparações apresentam granulócitos fixados com etanol e com formol para permitir a distinção dos dois padrões – cANCA (padrão citoplasmático, antígeno PR3) e pANCA (padrão perinuclear, antígeno MPO). Em certas situações recorre-se a granulócitos fixados pelo metanol para classificar o padrão xANCA.

Estômago de primata e suspensão de factor intrínseco

Esta preparação é utilizada na pesquisa de anticorpos anti-factor intrínseco (FI) e anti-célula parietal. As lâminas contêm secções de estômago de primata e gotas microscópicas de uma suspensão que contém FI.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Imunoensaios enzimáticos

MicroElisa

A metodologia de MicroElisa é utilizada para identificação e quantificação de autoanticorpos. A técnica está automatizada e é realizada no aparelho MAGO da Diamedix.

É um método imunoenzimático em sandwich que detecta o anticorpo no soro. Utilizam-se anticorpos monoclonais, quer para revestir as microplacas, que se unirão ao anticorpo presente na amostra, quer para detectar o anticorpo ligado nas microplacas sensibilizadas (reagente conjugado: anticorpos monoclonais ligados à peroxidase). O excedente é eliminado por lavagem da placa e a seguir adiciona-se o substrato que reagirá com o complexo formado, originando uma reacção de cor azul, que depois passa a amarelo quando se junta a solução de paragem (ácido). A absorvância (densidade óptica) das amostras e controlos é lida com um espectrofotómetro configurado com um comprimento de onda de 450 nm.

Este Laboratório de Imunologia dispõe de ensaios de MicroElisa para a pesquisa de anticorpos anti-dsDNA, anti-célula parietal, anti-antigénios mitocondriais M2 e antifosfolípidos (anti- β -glicoproteína I e anti-cardiolipina).

Imunoblot

A metodologia Imunoblot é utilizada para identificação qualitativa de anticorpos. A técnica está automatizada e é realizada no aparelho EUROBlotMaster da Euroimmun. Os vários antigénios estão depositados numa membrana de nitrocelulose. Cada tira contém vários antigénios o que permite, num único teste, identificar vários anticorpos. O princípio do método é semelhante ao método ELISA. A tira é incubada com uma diluição do soro a analisar. Os anticorpos, se presentes, ligam-se aos respectivos antigénios e as ligações não específicas são removidas pela lavagem. A ligação é detectada por uma anti-globulina humana conjugada com uma enzima que se liga ao anticorpo. Esta reacção é revelada pela adição do substrato que após reacção com a enzima forma um composto corado.

Este Laboratório de Imunologia dispõe de imunoblots para a pesquisa de ANA, anticorpos contra antigénios hepáticos, auto-anticorpos associados a miosites, auto-anticorpos associados a

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

esclerose sistémica e anticorpos anti-mieloperoxidase (MPO), anti-proteinase 3 (PR3) e anti-membrana basal glomerular (GBM).

Doseamento do factor reumatóide

Os factores reumatóides são auto-anticorpos dirigidos contra o fragmento Fc das imunoglobulinas. São geralmente anticorpos da classe IgM. A sua pesquisa é mais frequente na confirmação de um diagnóstico clínico de artrite reumatóide. Encontram-se em cerca de 80% dos indivíduos com esta patologia após um ano de evolução e o seu título correlaciona-se com a severidade da doença.

Neste Laboratório de Imunologia o factor reumatóide é determinado por duas técnicas, uma técnica mais específica – Reacção de Waller-Rose, a qual será referida no sector da serologia e uma técnica mais sensível – o RA Teste, sendo este doseamento efectuado por nefelometria no aparelho BN ProSpec (Siemens).

3. SECTOR DA SEROLOGIA

A serologia refere-se ao conjunto de técnicas imunológicas utilizadas na pesquisa de anticorpos e antígenos no soro do doente. Estas técnicas são particularmente úteis no diagnóstico de doenças infecciosas ao detectar anticorpos produzidos especificamente em resposta ao agente infeccioso.

3.1 Serologia para *Brucella*

A brucelose, também conhecida como febre ondulante, febre mediterrânica, febre de malta ou doença de Bang é causada por uma bactéria intracelular facultativa do género *Brucella*, transmitida ao homem pelo gado caprino, ovino, bovino e suíno. É uma zoonose com distribuição universal e várias vias de transmissão: contacto (maioria dos casos de doença profissional), inalação e ingestão de produtos lácteos não pasteurizados, nomeadamente leite e queijo fresco. A brucelose é muitas vezes assintomática, a manifestação mais frequente é a febre acompanhada de cefaleias, mialgias, artralgias, astenias, calafrios e suores.

Reconhecem-se seis espécies diferentes: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, sendo as quatro primeiras responsáveis pela maioria dos casos de doença humana. O “diagnóstico de certeza” da brucelose implica o isolamento da bactéria do sangue, medula óssea ou outros tecidos. Na ausência de confirmação bacteriológica um diagnóstico presuntivo pode ser feito pela pesquisa de anticorpos específicos no soro. O serodiagnóstico clássico das infecções agudas por *Brucella* baseia-se na pesquisa e titulação dos anticorpos da classe M (aglutinantes) e IgG e IgA anti-antígenos polissacarídicos da parede celular.

Reacção de Huddleson

A reacção de Huddleson é uma reacção de aglutinação directa, executada em placa, que utiliza uma suspensão antigénica de *Brucella abortus*. É um teste rápido, recomendado para pesquisar a presença de anticorpos anti-*Brucella* essencialmente da classe IgM mas também IgG, no soro dos doentes com suspeita clínica de brucelose. Obtém-se resultados positivos entre o 8º e o 10º dia da doença (brucelose aguda). A reacção é negativa em quase todos os casos de brucelose crónica e

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

apresenta títulos de anticorpos baixos nas situações de infecção subaguda pelo que não serve para rastreio. Em caso de positividade são efectuadas diluições seriadas da amostra.

Pesquisa de anticorpos totais anti-*Brucella abortus* (BrucellaCapt)

A pesquisa de anticorpos totais anti-*Brucella* permite detectar anticorpos aglutinantes e também os não aglutinantes ou incompletos. Os anticorpos incompletos são da classe IgG e IgA e surgem de forma persistente em níveis séricos elevados na brucelose crónica, pelo que a sua pesquisa é utilizada na detecção das formas crónicas de brucelose.

Estes anticorpos reagem com o antigénio mas não apresentam capacidade de aglutinação. Para detectar a reacção é necessário adicionar um anticorpo anti-imunoglobulina humana de forma a visualizar a aglutinação. É um método de imunocaptura e aglutinação executado em microplacas revestidas com imunoglobulina anti-humana, às quais se adiciona a amostra de soro e o antigénio (suspensão de *Brucella abortus*). O teste é positivo quando se observa aglutinação distribuída pelas paredes do tubo e é negativo quando se observa um botão de bactérias no centro do poço.

3.2 Serologia para *Salmonella*

Na maioria dos casos, a salmonelose é adquirida pela ingestão de alimentos e de água, contaminados ou por contacto fecal-oral. As aves e os animais contaminados constituem o principal reservatório de *Salmonella* não *typhi* e transmitem a doença ao homem. O reservatório de *S. typhi* é o homem, que é também o principal disseminador da febre tifóide, na fase aguda da doença ou no estado de portador assintomático.

A nomenclatura dos diferentes serótipos de *Salmonella* é bastante controversa, no entanto continua a usar-se frequentemente o nome do serótipo como sendo o nome da espécie (ex. *S. paratyphi* A). A definição do serótipo baseia-se na caracterização dos antigénios O (parte sacarídica do LPS, antigénio somático) e antigénios H (flagelares).

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Reacção de Widal

O diagnóstico laboratorial da febre tifóide (*S. typhi*) e paratifóide (*S. paratyphi* A e B) é feito, frequentemente, pela reacção de Widal, a qual quantifica os anticorpos anti-O e anti-H, presentes no soro do doente, por reacção de aglutinação directa em placa com suspensões antigénicas de *Salmonella* (paratyphi A O, paratyphi A H, paratyphi B O, paratyphi B H, Typhi O, Typhi H).

Uma elevação paralela e acentuada dos dois anticorpos O e H permite fazer o diagnóstico. Nos outros casos, é necessário ter em conta as características de cada tipo de anticorpos. O anticorpo anti-O aparece por volta do 8º dia, atinge o máximo pelo 12º dia apresentando níveis medianamente elevados, depois decresce regularmente para desaparecer a meio do 2º mês. O antígeno H aparece pelo 12º-14º dias, atinge níveis mais elevados e persiste vários anos, por vezes indefinidamente.

Actualmente existe alguma controvérsia quanto ao interesse clínico da reacção de Widal. Apenas cerca de 65% dos indivíduos com febre tifóide acabam por atingir um título definitivamente anormal. Podem ocorrer falso-positivos com reacções cruzadas com outras condições. Resultados falso-negativos podem surgir no início da infecção ou devido à antibioterapia.

3.3 Serologia para *Streptococcus pyogenes*

O *Streptococcus pyogenes* é um estreptococcus beta-hemolítico que possui o antígeno A de Lancefield. As infecções que provoca podem ser localizadas (exs. impetigo, erisipela, faringite) e disseminadas (exs. escarlatina, febre puerperal, sépsis). Pode ainda originar doenças pós-estreptocócicas de mecanismo imunológico (exs. febre reumática, glomerulonefrite) que se manifestam várias semanas após a infecção primária. Os antígenos da bactéria são semelhantes aos que se encontram em algumas articulações, microfibrilhas cardíacas e células renais. Assim, os anticorpos produzidos no decurso da infecção podem depositar-se nos tecidos, formando complexos antígeno-anticorpo.

Determinação do título de anticorpos anti-estreptolisina O (TASO)

O *Streptococcus pyogenes* produz várias proteínas, algumas com actividade enzimática, entre as quais a estreptolisina O. A estreptolisina O é uma proteína hemolítica no estado reduzido, mas que é rapidamente inactivada na presença do oxigénio (O = oxigénio lábil). É responsável pela hemólise produzida nas zonas dos meios de cultura não expostas a oxigénio, nas colónias do interior daqueles meios de cultura (meios de agar sangue). É uma proteína fortemente antigénica. A detecção de anticorpos específicos antiestreptolisina O é uma prova serológica muito usada para detectar infecções anteriores por *Streptococcus pyogenes*. Valores elevados são encontrados nas doenças imunes pós-estreptocócicas. O doseamento é efectuado por nefelometria no aparelho BN ProSpec (Siemens).

3.4 Serologia para *Treponema pallidum*

A sífilis, infecção sexualmente transmissível histórica, é devida a uma espiroqueta, *Treponema pallidum*. A história natural desta infecção, na ausência de diagnóstico e de tratamento, caracteriza-se classicamente por três fases: uma infecção local primária (cancro satélite), seguida por uma fase secundária em que predominam as manifestações sistémicas, que se podem complicar afectando o sistema nervoso e cardiovascular na fase terciária.

Após um forte decréscimo da sífilis depois da 2ª Guerra Mundial, devido principalmente à introdução da penicilina, actualmente assiste-se a um aumento da pandemia, facto que tem sido relacionado com a infecção por VIH/SIDA. A sífilis pode ser transmitida ao feto, durante a fase de gestação, especialmente a partir da 10ª semana de gravidez (transmissão vertical). A criança pode apresentar sífilis congénita, ou porque contraiu a infecção através do sangue materno, via placenta, ou porque aquela se processou ao atravessar o canal de parto.

O diagnóstico da sífilis é feito maioritariamente por reacções serológicas, detectando-se no soro dos doentes anticorpos que reagem *in vitro* com uma suspensão coloidal de lípidos (métodos não-treponémicos) ou com antigénios de *Treponema pallidum* (métodos treponémicos).

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Os métodos não treponémicos são inespecíficos e detectam anticorpos da classe IgG e IgM contra lípidos da superfície celular de *Treponema pallidum*. O antígeno usado é constituído por cardiolipina (extraído de tecido animal), lecitina e colesterol. Os testes mais usados são o VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) e o RPR (*Rapid Plasma Reagin*). Ambos medem a floculação dos antígenos lipídicos com o soro dos doentes infectados. Estes métodos são baratos, de fácil execução e interpretação. O RPR utiliza partículas de carvão activado com os antígenos lipídicos adsorvidos e a reacção é visível a olho nú, não requer descomplementação do soro e pode ser executado no plasma ao contrário do VDRL, que requer o uso de microscopia e a descomplementação do soro.

São testes que, em caso de infecção sífilítica não tratada, podem ser positivos a partir da 2ª ou 3ª semana pós-infecção. Os testes não-treponémicos são utilizados na monitorização da eficácia da terapêutica com antibióticos e no diagnóstico da neurosífilis. Não detectam precocemente a sífilis e exibem falta de sensibilidade na sífilis tardia. Podem ocorrer resultados falso-positivos com estes métodos, requerendo a confirmação dos resultados pelos métodos treponémicos. Tal facto deve-se ao aparecimento de anticorpos antilipídicos, em resposta a doenças não-treponémicas, agudas e crónicas, em que ocorre destruição tecidual (ex. doenças auto-imunes), nas grávidas e nos idosos.

Os testes não-treponémicos podem ser usados quantitativamente, permitindo avaliar a mais alta diluição do soro em que ocorre reacção positiva que, geralmente, vai decrescendo ao longo do tratamento com antibióticos. Testes positivos podem tornar-se negativos 6 a 20 meses após tratamento eficaz.

Os métodos treponémicos utilizam como antígeno *Treponema pallidum* sendo por isso mais específicos que os métodos não-treponémicos. Os testes mais usados são o FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absortion*), o TPHA (*Treponema Pallidum Hemagglutination*) e a metodologia imunoenzimática (ELISA).

O FTA-ABS utiliza, como antígeno, uma estirpe de *Treponema pallidum* morta. Nos soros positivos, os anticorpos recobrem a estirpe antigénica, sendo a reacção visualizada com recurso a

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

marcadores fluorescentes num microscópio de fluorescência. Este é o primeiro teste a tornar-se positivo na sífilis primária. Ele é, igualmente, um bom teste para diagnosticar a sífilis congénita, se forem detectados IgM FTA no sangue do recém-nascido.

O TPHA utiliza uma suspensão de eritrócitos de peru sensibilizados com *Treponema pallidum*. A hemaglutinação ocorre com o soro sanguíneo dos indivíduos com sífilis. É o método mais utilizado, pois é de fácil execução, leitura e interpretação dos resultados.

Os testes treponémicos detectam mais precocemente a sífilis primária e permanecem positivos na sífilis tardia. Os testes treponémicos são pouco influenciados pela terapêutica. A especificidade dos testes treponémicos é elevada, mas ocorrem, mesmo assim, resultados falso-positivos, principalmente nos indivíduos com elevado teor de γ -globulinas e nas doenças auto-imunes (ex. LES).

De acordo com a literatura recente e as últimas *guidelines* publicadas este Laboratório de Imunologia estabeleceu o seguinte protocolo para o diagnóstico serológico da sífilis:

Teste de rastreio/diagnóstico

São recomendados os testes treponémicos – EIA (IgG e IgM) ou TPHA.

Os teste não treponémicos não se recomendam como testes de rastreio devido ao número elevado de falsos negativos associados sobretudo a fenómenos de pró-zona.

Para o rastreio o Laboratório optou por um teste de MicroElisa (IgG e IgM) por ser sensível na infecção primária e ser automatizado (MAGO da Diamedix).

Teste confirmatório

Recomenda-se um teste treponémico diferente do utilizado no rastreio – TPHA.

O Laboratório dispõe também de um teste de MicroElisa para o doseamento de anticorpos anti-IgM.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Monitorização terapêutica

É recomendado um teste não treponémico semi-quantitativo. O Laboratório optou por fazer o RPR.

Determina-se o título numa amostra colhida no dia em que é iniciado o tratamento e depois faz-se o seguimento aos 1, 2, 3, 6 e 12 meses após o início do tratamento. O título deve diminuir duas diluições nos primeiros 6 meses.

3.5 Serologia para *Rickettsia conorii*

As bactérias da família *Rickettsiaceae* são bactérias Gram negativas, parasitas obrigatórios de células eucariotas. Têm como hospedeiros naturais e vectores os artrópodes. A *Rickettsia conorii* provoca febre botonosa mediterrânea que se caracteriza pelo aparecimento de febre, exantema e mancha negra ou de inoculação na zona de picada da carraça. A técnica clássica para o diagnóstico serológico consiste na imunofluorescência indirecta, mas pode ser substituída por uma técnica imunoenzimática com resultados bastante semelhantes em termos de sensibilidade e especificidade. Pode demonstrar-se IgM específica contra a *Rickettsia conorii* desde a primeira semana da doença. O laboratório utiliza uma técnica de MicroElisa (IgM e IgG) automatizada no aparelho MAGO da Diamedix.

3.6 Serologia para o vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV) pertence à família *Herpesviridae* e à subfamília *Gamaherpesvirinae*. As infecções por herpesvírus são caracterizadas por fenómenos de latência com capacidade de reactivação. A infecção por EBV pode produzir um ciclo produtivo com lise da célula infectada ou levar à imortalização celular. *In vivo* o EBV pode infectar linfócitos B e células epiteliais da orofaringe.

O EBV é um vírus ubiqüitário e com distribuição mundial. A principal via de transmissão do EBV é a saliva, embora a transfusão sanguínea possa, mais raramente, constituir também meio de transmissão. O vírus penetra no organismo humano através da cavidade oral, e replica-se no

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

epitélio da orofaringe e nas glândulas salivares. Os linfócitos B infectados difundem-se, a partir da orofaringe, quer pela via linfática, quer pela sanguínea, atingindo locais distantes onde formam focus de linfoproliferação. Após a primo-infecção o vírus permanece latente num pequeno número de linfócitos B, podendo ser reactivado e eliminado de forma intermitente.

A mononucleose infecciosa (MNI) corresponde à infecção primária pelo EBV. A MNI é uma doença linfoproliferativa, sistémica, de curta evolução e geralmente benigna. Caracteriza-se por um aumento do volume dos gânglios linfáticos, hepatoesplenomegália acompanhada de amigdalite, cefaleias, náuseas, mal-estar, prostração e febre prolongada, mas moderada, com picos nocturnos. Os linfócitos T respondem imunologicamente às células B infectadas, especialmente através da activação e da proliferação das células T supressoras (CD8), originando uma linfocitose e o aparecimento de linfócitos atípicos no sangue periférico (mais de 10%). O EBV também tem sido associado ao Linfoma de Burkitt, ao carcinoma da nasofaringe e à Tricoleucoplasia da língua em indivíduos imunodeprimidos.

O diagnóstico laboratorial de uma infecção por EBV pode fazer-se, quer pela detecção do vírus ou de constituintes da partícula vírica, quer pelo estudo da resposta imunitária. Existem, também, marcadores não específicos que podem contribuir para o diagnóstico da mononucleose infecciosa.

O diagnóstico da infecção primária por EBV, ou MNI, pode, frequentemente, basear-se em dados hematológicos, testes hepáticos e na pesquisa de anticorpos heterófilos. Os anticorpos heterófilos humanos aparecem em cerca de 60 a 80% das MNI. Estes anticorpos, IgM, reagem com hemácias de mamíferos (ex. bovinos). Estes anticorpos atingem o seu teor máximo 2 a 3 semanas após o seu aparecimento e desaparecem, normalmente, ao fim de 1 a 3 meses, embora se tenha demonstrado que podem persistir durante um ano. É um teste específico, mas apresenta uma fraca sensibilidade. Cerca de 15% das MNI em jovens adultos e uma percentagem ainda mais elevada em crianças, não apresentam anticorpos heterófilos.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

A detecção de anticorpos heterófilos associados à Mononucleose Infecciosa (MONOSPOT) é efectuada por uma técnica de aglutinação directa em placa semi-quantitativa. São utilizadas partículas de látex revestidas com antígenos extraídos de hemácias bovinas.

3.7 Serologia para *Echinococcus granulosus*

O *Echinococcus granulosus* é um céstode cujo hospedeiro definitivo é o cão (ténia do cão), podendo ter como hospedeiro intermediário o Homem ou outros animais. No Homem é responsável pela hidatidose, patologia que resulta do desenvolvimento no organismo das formas larvares deste parasita. Estas formas larvares evoluem para quistos (quisto hidático) no tecido onde se instalam (exs. hepático, pulmonar).

Neste laboratório é utilizado um método de hemaglutinação indirecta para a pesquisa de anticorpos anti-*Echinococcus granulosus*. O reagente é constituído por eritrócitos de carneiro sensibilizados com o antígeno do *Echinococcus granulosus*. A utilização de eritrócitos não sensibilizados como reagente controlo assegura a especificidade da reacção e permite a eliminação de interferências devido à presença de aglutininas naturais (por ex. anticorpos heterófilos). Na presença de anticorpos específicos os eritrócitos aglutinados formam uma rede que cobre o fundo do poço. Na ausência dos anticorpos, os eritrócitos livres sedimentam no fundo e formam um botão de cor intensa.

3.8 Detecção do antígeno galactomanano de *Aspergillus*

A aspergilose é uma micose oportunista com distribuição mundial causada por fungos filamentosos do género *Aspergillus*. As formas invasivas de aspergilose constituem um sério problema em indivíduos com aplasia secundária induzida pela terapêutica em doenças hematológicas malignas e cancro, em doentes imunossuprimidos após transplante de órgãos, em particular transplantados de medula óssea. O tratamento é tanto mais eficaz quanto mais precocemente for iniciado, mas o diagnóstico cultural de aspergilose invasiva é difícil de estabelecer.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Após o tratamento prévio das amostras de soro pelo calor em presença de EDTA para dissociar os complexos imunes e precipitar as proteínas que possam interferir com o teste, a detecção do antígeno galactomanano é um teste imunoenzimático, os resultados são semi-quantitativos e são apresentados sob a forma de um índice a partir do qual é possível estabelecer um resultado qualitativo (positivo ou negativo). Contudo, o resultado não deve ser utilizado isoladamente e sim em conjunto com os dados clínicos que suportem a interpretação

3.9 Titulação do factor reumatóide

Neste Laboratório de Imunologia o factor reumatóide é determinado por duas técnicas, uma técnica mais sensível referida anteriormente no sector da autoimunidade – RA Teste (nefelometria) e outra técnica mais específica – Reacção de Waller-Rose.

Reacção de Waller-Rose

É utilizado um método de hemaglutinação indirecta em microplaca. A reacção utiliza uma suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados com um antígeno IgG de carneiro. A utilização de eritrócitos não sensibilizados como reagente controlo assegura a especificidade da reacção e permite a eliminação de interferências devido à presença de aglutininas naturais (por ex. anticorpos heterófilos). Na presença de anticorpos específicos os eritrócitos aglutinados formam uma rede que cobre o fundo do poço. Na ausência dos anticorpos, os eritrócitos livres sedimentam no fundo e formam um botão de cor intensa.

4. SECTOR DOS MARCADORES TUMORAIS

As células neoplásicas podem produzir ou induzir noutras células a formação de substâncias características, segundo o seu fenótipo maligno, as quais traduzem a actividade, metabolismo ou diferenciação do tecido tumoral podendo ajudar no diagnóstico ou no controlo evolutivo da neoplasia. Tais substâncias designam-se por marcadores imunobiológicos de tumores ou simplesmente marcadores tumorais. Estes marcadores são pois a expressão de fenómenos colaterais da transformação neoplásica.

Idealmente um marcador tumoral deveria satisfazer os seguintes requisitos:

- especificidade – só deve ser produzido pelo tecido tumoral em questão, com exclusão de qualquer outro tecido;
- sensibilidade – deve ser capaz de detectar a presença de um tumor, mesmo nos estádios mais precoces;
- interesse clínico – deve possuir interesse no diagnóstico, prognóstico e na monitorização terapêutica e deve possuir valores correlativos ao estadio da doença.

No entanto, os marcadores de que se dispõe actualmente não satisfazem estas exigências em todos os seus aspectos.

A monitorização da terapêutica é a área na qual a maioria dos marcadores tumorais encontrou um papel fundamental. A diminuição da concentração do marcador tumoral é uma indicação do sucesso do tratamento, seja este cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou uma combinação destes. A velocidade de diminuição da concentração do marcador deve estar de acordo com a prevista tendo em conta a semi-vida do marcador. Uma diminuição mais lenta do que a esperada poderá indicar que o tumor não foi totalmente eliminado.

Mesmo quando o tratamento teve sucesso é conveniente continuar a monitorizar o marcador tumoral durante algum tempo após os seus níveis terem estabilizado. Um aumento poderá indicar uma recorrência. A detecção de concentrações crescentes do marcador permite que uma segunda linha de tratamento seja rapidamente implementada.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM IMUNOLOGIA

Isoladamente, os marcadores tumorais raramente são usados para estabelecer um diagnóstico, poderão alguns, num determinado contexto clínico, auxiliar no diagnóstico. Para ter valor prognóstico, a concentração do marcador deve correlacionar-se com a massa do tumor. Por exemplo, a HCG (gonadotrofina coriônica humana) e a AFP (alfa-fetoproteína) correlacionam-se com a massa tumoral do cancro do testículo.

Actualmente este Laboratório de Imunologia faz apenas o doseamento sérico de três marcadores tumorais: NSE, Cyfra 21.1 e Ca 72.4. Outros marcadores tumorais são efectuados no Laboratório de Bioquímica.

4.1 Equipamento

COBAS 411 (Roche).

4.2 Fundamento

O COBAS 411 é um analisador automático de imunoensaio que avalia o imunocomplexo formado por electroquimioluminiscência. Na electroquimioluminiscência a emissão de luz é obtida mediante uma reacção química (reacção de oxidação) gerada na superfície de um eléctrodo quando é aplicada uma voltagem. O método utiliza dois anticorpos monoclonais específicos do antigénio, um marcado com ruténio e um anticorpo biotinilado. No primeiro passo os dois anticorpos monoclonais ligam-se ao antigénio presente na amostra formando um complexo *sandwich*. A fase sólida é constituída por micropartículas de estreptavidina, às quais se fixa o complexo *sandwich* através da interacção da biotina com a estreptavidina, que possuem elevada afinidade. A mistura de reacção é então aspirada para a câmara de leitura onde as micropartículas são fixadas magnéticamente à superfície de um eléctrodo. A aplicação de uma corrente eléctrica induz a emissão de quimioluminiscência que é medida por um fotomultiplicador.

4.3 Parâmetros

Enolase específica dos neurónios (NSE)

A NSE é uma isoenzima da enolase que intervém na glicólise anaeróbia e está presente no tecido neuronal e nas células do sistema neuroendócrino. As determinações de NSE são utilizadas na monitorização de doentes com carcinoma das pequenas células do pulmão e neuroblastomas. Em resposta à terapêutica pode observar-se aumentos temporários de NSE nas 24 a 72h após a administração do 1º ciclo de quimioterapia devido à citólise abundante de células tumorais. São detectadas concentrações aumentadas de NSE em doentes com doença benigna do pulmão e do cérebro.

Cyfra 21.1

Designa-se por Cyfra 21.1 o conjunto de fragmentos solúveis de uma proteína do citoesqueleto das células dos epitélios simples, a citoqueratina 19. O Cyfra 21.1 é um marcador de eleição do carcinoma de células não pequenas do pulmão. Também é marcador do carcinoma da bexiga de formas músculo invasivas. A sua principal indicação é na monitorização da evolução destes dois tumores. Valores ligeiramente elevados podem surgir na insuficiência renal e na doença hepática. As doenças pulmonares benignas como a doença obstrutiva crónica e doenças infecciosas apresentam valores elevados.

Ca 72.4

O Ca 72.4 é uma glicoproteína presente em adenocarcinomas, especialmente digestivos. O interesse deste marcador reside mais na sua especificidade do que sensibilidade. É considerado marcador do carcinoma gástrico e também do ovário. São encontrados valores séricos aumentados de Ca 72.4 em algumas situações benignas designadamente pancreatite, cirrose hepática, pneumopatias, doenças reumáticas, doenças ginecológicas, quistos ováricos, doenças gastrointestinais e doenças da mama.

CONTROLO DE QUALIDADE

De modo a monitorizar os ensaios no Laboratório de Imunologia e a garantir a precisão e exactidão dos mesmos, são empreendidos dois tipos de controlos:

- Controlo de qualidade interno
- Avaliação externa da qualidade

Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é feito através da análise de materiais de referência, designadamente controlos comerciais, em simultâneo com as amostras a ensaiar de acordo com periodicidades determinadas e que permite avaliar o desempenho dos ensaios. São utilizados os controlos recomendados pelo fornecedor. Estes produtos são fornecidos liofilizados ou prontos a usar e são reconstituídos e conservados de acordo com o que vem referido na bula do produto.

Para avaliação e documentação do controlo de qualidade interno são criados gráficos de Levey-Jennings para os níveis de controlo de cada parâmetro. A visualização destes gráficos permite determinar o comportamento do controlo e desta forma detectar erros sistemáticos e aleatórios. A aplicação das regras de Westgard ao comportamento do controlo de qualidade permite facilitar a avaliação do processo analítico e orientar a aplicação de medidas correctivas.

Sempre que no processo de verificação do controlo os resultados não obedecerem aos critérios de confiança devem ser tomadas as medidas correctivas adequadas para eliminar as causas do erro. Antes de qualquer medida correctiva deve ser verificado o estado do controlo (aspecto e validade) e repetido se necessário, para eliminar a hipótese de um mau resultado devido a um mau estado do controlo. Se o controlo não corrige após esta verificação repete-se a calibração do aparelho para os parâmetros não conformes e novamente o controlo. Se a anomalia se mantém chama-se a assistência técnica.

Avaliação externa da qualidade

A avaliação externa da qualidade também denominada avaliação de proficiência, avaliação do desempenho ou controlo de qualidade externo, consiste na avaliação do desempenho do Laboratório de Imunologia através da análise dos resultados obtidos/emitidos nos exames de material de controlo, realizados da forma e nas condições habituais de funcionamento.

Na prática, a avaliação externa da qualidade consiste num sistema em que amostras de conteúdo conhecido mas não revelado (amostras fictícias), são introduzidas no laboratório por uma entidade externa de referência para serem examinadas exactamente da mesma forma que são examinadas na prática habitual do laboratório as amostras semelhantes dos doentes/utentes. Os resultados obtidos são depois comparados com os resultados esperados e estatisticamente tratados pela entidade organizadora.

Este Laboratório de Imunologia participa nos seguintes programas de avaliação externa da qualidade:

- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).
- *United Kingdom National External Quality Assessment Service (NEQAS).*
- *United Kingdom Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS).*
- *Germany Society for Promotion of Quality Assurance in Medical Laboratories (INSTAND).*

Periodicamente os resultados são avaliados e discutidos em reuniões de Serviço com os responsáveis e todos os colaboradores envolvidos, sendo estes resultados os parâmetros fundamentais para avaliação do desempenho e do funcionamento dos serviços e considerados como referências nas auditorias internas e externas do Laboratório.

CONCLUSÃO

O Estágio no Laboratório de Imunologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa foi uma experiência profissional muito enriquecedora. O IPO dirige a sua actividade para o tratamento de doentes oncológicos permitindo o contacto com um elevado número de amostras patológicas, o que facilita e valoriza a aprendizagem.

No período em que decorreu o estágio trabalhei em todos os sectores do laboratório, tendo tido a possibilidade de efectuar todas as técnicas, interpretar e validar resultados. Algumas técnicas de Imunologia já tinha tido oportunidade de realizar na minha actividade anterior, no entanto, pude também contactar com técnicas novas e mais elaboradas, sobretudo no sector da Autoimunidade.

Para além da forte componente prática que o estágio inclui adquiri também conhecimentos teóricos sobre o diagnóstico e monitorização de doenças envolvendo o sistema imunitário (neoplasias, doenças infecciosas, imunodeficiências, doenças autoimunes), capacidade de selecção e interpretação dos procedimentos técnicos e capacidade de contextualização dos parâmetros laboratoriais nas situações clínicas mais comuns envolvendo o sistema imunitário.

Por tudo isto considero que o plano de Estágio referido na introdução foi cumprido e que os objectivos do estágio contidos no Regulamento dos estágios profissionalizantes do Mestrado em Análises Clínicas (Artigo 2º) foram atingidos, nomeadamente a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde, a aplicação dos conhecimentos adquiridos num contexto de trabalho, a capacidade de trabalho multidisciplinar e em equipa e o contacto com os doentes aplicando princípios éticos e deontológicos.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu I, Machado Caetano JA. Sobre a importância do uso de células HEp-2 na identificação de anticorpos anti-fuso mitótico e na distinção dos diferentes padrões nucleares. *Revista portuguesa de reumatologia*. 1991;2,13:285-297.
- Biorad. Autoimmune CD, education and training tools [CD-ROM]. 2009.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
- Caquet R. *Guia prático de análises clínicas*. 1ª ed. Lisboa: Climepsi; 2004.
- Catarino, MM. Apontamentos da cadeira de Imunologia complementar, 4º Curso de Especialização de Pós-Licenciatura em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa 2003.
- Cooper WG. *Lições básicas sobre controle de qualidade laboratorial*. California: Bio-rad laboratories; 2000.
- Ferreira A, Ávila S. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- Ferreira W, Sousa JC, editores. *Microbiologia*, volume 2. Lisboa: Lidel; 2000.
- Ferreira W, Sousa JC, editores. *Microbiologia*, volume 3. Lisboa: Lidel; 2002.
- *Manual da Qualidade do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa*, Francisco Gentil.
- *Métodos de ensaio do Laboratório de Imunologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa*, Francisco Gentil.
- Ravel R. *Laboratório clínico*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
- Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL, editores. *Autoantibodies*. 2ª ed. Philadelphia: Elsevier; 2007
- Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME, editores. *Diagnostic criteria in autoimmune diseases*. Human Press; 2008.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

OBJECTIVO

O Estágio profissional na valência de Microbiologia é parte integrante do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu no Laboratório Médico Dr.^a Quintino Rogado em Sacavém sob a orientação da Dr.^a Maria Hortência Pacheco Arruda Albergaria e Melo, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos e co-responsável do Laboratório, no período compreendido entre 21 de Setembro de 2010 a 29 de Outubro de 2010 (228 horas).

O presente relatório tem como objectivo fazer uma apresentação do Laboratório onde decorreu o estágio e descrever a minha actividade na secção de Microbiologia do referido laboratório, destacando os aspectos mais relevantes no que diz respeito à experiência adquirida, quer do ponto de vista técnico quer do ponto de vista da sua aplicação à clínica.

INTRODUÇÃO

O Laboratório Médico Dr.^a Quintino Rogado é uma instituição privada prestadora de cuidados de saúde na área das análises clínicas com uma capacidade de resposta multidisciplinar actuando em diversas áreas: Hematologia, Microbiologia, Imunologia, Endocrinologia, Bioquímica e Toxicologia.

Na prossecução dos seus objectivos de assistência à comunidade em que se insere, atendeu no ano de 2010 30 000 doentes, 13 000 do sexo masculino e 17 000 do sexo feminino. Foram executadas 450 170 análises distribuídas por:

- Bioquímica – 310 000
- Hematologia – 90 000
- Microbiologia – 34 000
- Endocrinologia – 16 000

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- Toxicologia – 170

Considerando a Microbiologia nas suas quatro vertentes – bacteriologia, parasitologia, micologia e virologia – este relatório considera apenas o exercício desenvolvido para as três primeiras disciplinas e no âmbito da actividade de um Laboratório de Análises Clínicas de rotina e apoio à comunidade.

Na elaboração deste relatório procurei fazer uma apresentação geral do meu trabalho neste sector, referindo nomeadamente os produtos biológicos analisados, as normas de colheita e de transporte, os microrganismos mais comuns, o exame directo, os meios de cultura, os testes de identificação, o teste de sensibilidade aos antibióticos e o controlo de qualidade.

O plano de Estágio para a Valência de Microbiologia foi o seguinte:

- a) Conhecimento das condições exigidas para a obtenção dos diferentes produtos biológicos: urina, exsudados (vaginal/uretral, nasal e orofaríngeo, auricular, ocular, abscessos e feridas), fezes, expectoração e outros fluidos biológicos.
- b) Conhecimento das condições de transporte e conservação dos diferentes produtos biológicos, de acordo com os requisitos de manipulação.
- c) Conhecimento e manipulação das metodologias conducentes à identificação dos agentes bacterianos incluindo selecção de meios de cultura, sementeira, isolamento, identificação, exame macroscópico e microscópico, testes de sensibilidade aos antibióticos.
- d) Identificação de fungos e leveduras através de exame directo e/ou cultural, testes de sensibilidade aos antifúngicos.
- e) Pesquisa de ovos, quistos e parasitas em diferentes produtos biológicos.
- f) Manuseamento, tratamento e interpretação dos resultados das amostras de controlo de qualidade interno e de avaliação externa da qualidade.

1. EXAME MICROSCÓPICO

1.1 Introdução

O exame microscópico é a primeira etapa do estudo e identificação de um microrganismo. Nesta fase é efectuado o estudo da morfologia, a qual pode por vezes ser mais característica em meio natural (produtos biológicos) do que em cultura laboratorial. Além disso, os microrganismos podem ser acompanhados de elementos celulares cuja presença pode facilitar o diagnóstico. Em casos de flora microbiana complexa, apenas o exame microscópico directo pode revelar a predominância de uma ou mais espécies.

O exame microscópico inclui:

- Exame a fresco
- Exame após coloração

1.2 Exame a fresco

É realizado entre lâmina e lamela, utilizando a objectiva de 40x (com o condensador em baixo e o diafragma ligeiramente fechado), a partir de meio de cultura líquido, sólido ou ainda a partir de amostras biológicas. O exame microscópico a fresco permite apreciar a presença de elementos celulares e microrganismos (bactérias, fungos e parasitas).

1.3 Exame após coloração

Nas colorações são usados corantes que tingem as células aumentando o seu contraste, o que permite melhor observação ao microscópio óptico. As técnicas são executadas sobre esfregaços secos e fixados pelo calor - as formas vegetativas morrem, tornam-se permeáveis aos corantes e aderem à lâmina devido à precipitação do material proteico do citoplasma. O exame após coloração permite obter uma definição mais precisa da morfologia microbiana, diferenciar algumas bactérias em resultado das suas diferentes afinidades por corantes e ainda evidenciar detalhes da estrutura bacteriana.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Os corantes são compostos orgânicos e têm afinidades específicas para cada tipo de material celular. Os mais comuns são os corantes catiónicos que se combinam com constituintes celulares carregados negativamente (ex. ácidos nucleicos e polissacáridos acídicos). Como as superfícies das células são geralmente carregadas negativamente, estes corantes são inclusivamente bons corantes gerais, ficando as células todas da mesma cor.

A observação microscópica é feita com a objectiva de imersão (100x), usando óleo de imersão, com o condensador em cima e o diafragma aberto.

Execução de esfregaços

Antes da execução de qualquer tipo de coloração, é necessária a preparação de um esfregaço. Embora de fácil execução a preparação de um esfregaço requer alguns cuidados:

1. Preparação das lâminas

Lâminas perfeitamente limpas são essenciais para a execução de um esfregaço. Qualquer gordura ou óleo dos dedos deve ser removida por lavagem com água e sabão, seguida de passagem por água destilada e lavagem com álcool. Após limpeza, as lâminas secas devem ser guardadas até utilização.

2. Preparação do esfregaço

Um bom esfregaço é aquele que após seco aparece como uma camada fina esbranquiçada:

- Esfregaço a partir de amostras biológicas líquidas ou de culturas líquidas: colocar directamente sobre a lâmina limpa uma a duas ansas das células em suspensão, retiradas com ansa esterilizada e espalhadas em uma pequena área central.
- Esfregaço a partir de amostras biológicas sólidas ou de cultura em meio sólido: os microrganismos de uma cultura em meio sólido apresentam-se com superfície densa pelo que não podem ser colocados directamente na lâmina. Estas culturas devem ser diluídas colocando uma pequena gota de água destilada sobre a lâmina na qual as células vão em seguida ser suspensas. A transferência de células bacterianas de culturas em meio sólido requer a utilização de ansa em fio recto esterilizada. Apenas a ponta da ansa deve tocar a

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

cultura de modo a prevenir a passagem de demasiadas células. A suspensão é obtida pelo espalhar das células com movimento circular.

- Amostras espessas ou purulentas (ex. expectoração): utilizar a técnica de estiramento – colocar uma porção de produto numa lâmina e pressionando com outra lâmina, fazer deslizar as duas lâminas ao longo uma da outra, várias vezes.

3. Fixação pelo calor

Se não for efectuada fixação as células bacterianas vão desaparecer com a execução da coloração. Tal desaparecimento é evitado pela fixação pelo calor. Esta é efectuada pela passagem do esfregaço seco ao ar, duas a três vezes sobre a chama do bico de Busen.

Métodos de coloração

As colorações de tipo diferencial requerem pelo menos três reagentes químicos que são aplicados sequencialmente a um esfregaço fixado pelo calor. O primeiro reagente é designado por corante primário e irá corar todas as células. Com o fim de se estabelecer uma cor contrastante, utiliza-se um segundo reagente designado por agente descorante. Conforme a composição química dos elementos celulares, o descorante pode ou não remover o primeiro corante de toda a célula ou de apenas certas estruturas celulares. O reagente final é designado por contrastante por apresentar cor de contraste relativamente ao primeiro corante. Após a descoloração se o primeiro corante foi removido, os componentes celulares descorados irão adquirir a cor do contrastante. Desta forma, os tipos celulares e os seus elementos podem ser diferenciados com base na cor que retiverem.

As colorações diferenciais utilizadas neste Laboratório são as seguintes:

- Coloração de Gram
- Coloração para detecção de ácido álcool resistência – coloração de Ziehl-Neelsen

Coloração de Gram

A coloração de Gram foi descoberta por Gram em 1883 e o seu fundamento baseia-se na diferença de composição química e espessura das paredes bacterianas de que depende a permeabilidade ao álcool e à acetona e, em consequência, a dissolução mais ou menos rápida de

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

complexos corados formados no citoplasma. Esta coloração permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: as bactérias Gram (+) e as bactérias Gram (-).

As bactérias Gram (+), quando tratadas por um corante p-rosanilina trimetilmetano como o cristal violeta, e seguidamente pelo iodo, por exemplo, o lugol, que é um mordente – substância que permite melhor penetração do corante, fixam o corante de tal modo que este não é removido pela solução de descoloração, o álcool-acetona. Como exemplos de bactérias Gram (+) temos os *Staphylococcus* sp. e os *Streptococcus* sp..

As bactérias Gram (-), pelo contrário, são descoradas pela solução de álcool-acetona, porque o complexo violeta/iodeto formado é dissolvido e extraído através da membrana externa. De forma a que se possam observar melhor, são novamente coradas por um corante de contraste, geralmente vermelho-rosa (fucsina diluída ou safranina), que as distingue das bactérias Gram (+), coradas de violeta. Como exemplos de bactérias Gram (-) temos as pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*.

A preparação de esfregaços adequadamente corados requer que se retenha em mente as seguintes precauções:

- A fase mais crítica do processo é a descoloração a qual se baseia na facilidade com que o complexo primeiro corante/mordente é libertado da célula. Uma descoloração muito intensa irá resultar na perda do primeiro corante levando ao aparecimento de bactérias Gram (+) como Gram (-). No entanto, uma fraca descoloração resultará numa não libertação do complexo corante/mordente, de que resultará que bactérias Gram (-) surjam como Gram (+). Será necessário que cada um pratique de modo a obter uma boa descoloração.
- É necessário que os esfregaços sejam lavados em água corrente entre cada aplicação dos reagentes, isso removerá o excesso de corante preparando o esfregaço para a aplicação seguinte.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- As melhores colorações de Gram são efectuadas em esfregaços efectuados de culturas frescas, isto é com idade não superior a 24 horas. Culturas mais velhas, sobretudo no caso de células bacterianas Gram (+), levam a que os microrganismos percam a sua habilidade de reter o primeiro corante surgindo assim microrganismos variáveis ao Gram, algumas células Gram (+) e outras Gram (-).

Técnica

1. Preparar um esfregaço.
2. Secar ao ar e fixar ao calor.
3. Colocar sobre o esfregaço cristal violeta e deixar actuar durante 1 minuto.
4. Por cima do corante anterior colocar lugol e deixar actuar 1 minuto.
5. Retirar o corante e lavar com água corrente.
6. Descorar com o álcool-acetona.
7. Lavar com água corrente.
8. Colocar sobre o esfregaço fucsina e deixar actuar durante 1 minuto.
9. Lavar com água corrente.
10. Deixar secar ao ar.

Coloração de Ziehl-Neelsen

A superfície das bactérias do género *Mycobacterium* é rica em ácidos micólicos (lípidos complexos, ramificados, com cadeias longas). Estes lípidos tornam a membrana das micobactérias pouco permeável aos corantes usuais e além disso conferem-lhes a propriedade de álcool-ácido resistência.

Na coloração de Ziehl-Neelsen, o emprego de calor e de uma solução corante fenolada (fucsina de Ziehl), permite corar o citoplasma das micobactérias (Ziehl-Neelsen – 1885). Uma vez coradas, elas resistem bastante tempo à acção sucessiva de um ácido mineral forte e do álcool. Todas as outras células, bacterianas ou não (não ácido-álcool resistentes), perdem a sua coloração pela fucsina, sendo posteriormente recoradas pelo azul de metileno. Os bacilos álcool-ácido resistentes, quando corados, apresentam-se como finos bacilos vermelhos, ligeiramente encurvados, que se destacam nitidamente do fundo azul da lâmina.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Técnica

1. Cobrir o esfregaço com solução de fucsina e aquecer até à emissão de vapores. Deixar actuar durante 10 minutos.
2. Lavar com água.
3. Cobrir com a solução descorante (álcool-ácido) cerca de um minuto.
4. Lavar com água.
5. Corar com azul de metileno durante 15-20 segundos.
6. Lavar e deixar secar.

2. MEIOS DE CULTURA

2.1 Introdução

A maior parte das técnicas microbiológicas (conservação, isolamento, identificação ou contagem), exigem a utilização de meios de cultura, sendo a composição dos meios de cultura função dos conhecimentos sobre os princípios de nutrição microbiana. Os meios de cultura devem conter, de uma forma utilizável, os nutrientes necessários ao crescimento dos microrganismos, nomeadamente, macronutrientes (C, H, N, O, P, S, K, Mg, Na, etc.), micronutrientes (Fe, Cu, Zn, etc.), e factores de crescimento (por ex. vitaminas e aminoácidos). Para que se observe crescimento há ainda que incubar os meios em condições adequadas de tensão de oxigénio, temperatura, etc..

Somente em casos excepcionais, se pode identificar um microrganismo pelas suas características morfológicas. É portanto essencial obtê-lo em cultura em meio artificial e, na hipótese de estarem presentes diversas espécies, separá-las ou isolá-las em cultura pura, para se poderem efectuar testes de identificação.

Os meios de cultura podem ser classificados em função do seu tipo de utilização:

- meios de isolamento
- meios de enriquecimento
- meios de transporte

Meios de isolamento

Os meios de isolamento permitem a obtenção de culturas puras e podem ser de vários tipos:

1. Meios basais - permitem o crescimento de microrganismos pouco exigentes (ex. caldo nutritivo, água peptonada).
2. Meios selectivos - permitem o crescimento só de um tipo de microrganismo em detrimento dos outros cujo crescimento é inibido. Torna-se útil, no caso de uma população plurimicrobiana, porque permite favorecer a cultura preferencial de certos microrganismos.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

3. Meios diferenciais - são utilizados quando se pretende diferenciar entre vários microrganismos presentes no meio de cultura. Por exemplo, no caso da gelose de sangue, dado que algumas bactérias produzem enzimas (hemolisinas) que vão lisar os glóbulos vermelhos enquanto outras não, dependendo do padrão de hemólise pode-se distinguir entre bactérias hemolíticas e não hemolíticas.
4. Meios selectivos e diferenciais - alguns meios de cultura são simultaneamente selectivos e diferenciais. São sobretudo utilizados em microbiologia clínica e na área da saúde pública, como por exemplo na determinação da qualidade da água ou num surto de intoxicações alimentares (ex. gelose MacConkey, gelose Chapman).
5. Meios enriquecidos - os ambientes naturais são geralmente habitados por populações de vários tipos de microrganismos. Quando uma espécie tem especial interesse e é nutricionalmente exigente, encontrando-se presente num determinado produto mas em número muito baixo, é fundamental a utilização de um meio muito rico nutricionalmente e em que nenhum agente inibidor se encontre presente. Estes meios enriquecidos são meios basais adicionados de produtos biológicos ricos em nutrientes como o soro, ovo ou sangue (ex. gelose sangue, gelose chocolate).

Meios de enriquecimento

São meios líquidos que favorecem o crescimento de determinadas espécies aumentando a sua quantidade relativamente a outras, podendo conduzir depois a culturas puras por sobreposição de espécies (ex. caldo de selenito de sódio para enriquecimento de fezes em *Salmonella*).

Meios de transporte

Servem para o transporte de um determinado material biológico a partir do qual se propõe isolar um ou mais organismos. É então importante manter a viabilidade dos microrganismos nele existentes sem que haja multiplicação dos mesmos e também a sua quantidade relativa no produto biológico para que depois a inoculação dos meios origine resultados que reflectam a proporção relativa dos microrganismos nesse produto biológico (ex. meio de Amies).

Os meios de cultura utilizados neste Laboratório são os seguintes:

- Meio Lowenstein-Jensen (Biomérieux - Ref. 42 089)
- Caldo Selenito F (Biomérieux - Ref. 42 099)
- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (Biomérieux - Ref. 43 041)
- Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (Biomérieux - Ref. 42 116)
- Gelose SS (Biomérieux - Ref. 43 091)
- Gelose Mac Conkey (Biomérieux - Ref. 43 141)
- Gelose Candida ID 2 (Biomérieux - Ref. 43 631)
- Gelose Chapman 2 (Biomérieux - Ref. 43 671)
- Gelose CPS ID 3 (Biomérieux - Ref.43 541)
- Gelose Chocolate Haemophilus 2 (Biomérieux - Ref. 43 681)
- Gelose Chocolate PolyViteX (Biomérieux - Ref. 43 101)

2.2 Meios de cultura

Meio Lowenstein-Jensen (LJ-T)

Objectivo

O meio Lowenstein-Jensen destina-se à cultura de *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias.

Fundamento

Este meio, enriquecido com a presença de ovo, de aspargina e de fécula, favorece o crescimento das micobactérias.

Caldo Selenito F (SELENITO F-T)

Objectivo

Este meio destina-se ao enriquecimento de fezes em *Salmonella*.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Fundamento

A sua composição favorece o crescimento de *Salmonella* no seio de uma flora polimicrobiana. Após a etapa de enriquecimento, o caldo Selenito deve ser repicado para meios destinados à identificação destas bactérias. A subcultura para meio sólido deve ocorrer entre as 6 e 12 horas, pois esse é o prazo médio de inibição de outras estirpes, tal como o *Proteus* spp.

Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)

Objectivo

A gelose Columbia descrita por Ellner et al. é um meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. Adicionada com sangue de carneiro, torna-se um meio nutritivo muito rico adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, independentemente do metabolismo destas.

Fundamento

A gelose contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (ex. estreptococos, *Listeria*). A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana:

- hemólise α - coloração esverdeada à volta da colónia
- hemólise β - zona clara à volta da colónia ou por baixo da colónia

Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)

Objectivo

O caldo Todd Hewitt + Antibióticos é um caldo de enriquecimento selectivo destinado à detecção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida.

Fundamento

A sua composição favorece o crescimento dos estreptococos no seio de uma flora polimicrobiana. Os antibióticos presentes no meio, ácido nalidíxico e colistina, inibem a maioria dos microrganismos Gram (-) da flora de acompanhamento. Após a etapa de enriquecimento, o caldo deve ser repicado em meios destinados à detecção dos estreptococos.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Gelose SS (SS)

Objectivo

A gelose SS é um meio de isolamento selectivo e de diferenciação destinado à pesquisa das espécies de *Salmonella* e *Shigella* a partir de fezes. O meio permite evidenciar colónias que fermentam a lactose e reduzem o tiosulfato (produção de H₂S).

Fundamento

Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosa, os outros originam colónias incolores. Os microrganismos que produzem H₂S originam colónias com centro negro. A presença de colónias incolores ou ligeiramente coloridas com ou sem centro negro representa uma forte presunção de *Salmonella* ou de *Shigella*. A inibição das bactérias Gram (+) obtém-se pela mistura de sais biliare e de corantes.

Gelose Mac Conkey (MCK)

Objectivo

A gelose Mac Conkey com cristal violeta é um meio de isolamento selectivo e de diferenciação para a pesquisa de bactérias Gram (-), a partir de colheitas de origens diversas.

Fundamento

A gelose Mac Conkey com cristal violeta permite evidenciar a fermentação da lactose pela viragem do vermelho neutro. Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosas ou vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliare. Os microrganismos que não fermentam a lactose, originam colónias incolores ou ligeiramente bege. A selectividade em relação às bactérias Gram (+) é proporcionada pelos sais biliare e o cristal violeta.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Gelose Candida ID 2 (CAN 2)

Objectivo

A gelose Candida ID 2 é um meio que se destina ao isolamento selectivo das leveduras, à identificação da espécie *C. albicans* e à diferenciação presuntiva de um conjunto de espécies que agrupa *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. Kefyr*.

Fundamento

A hidrólise específica de um substrato cromogénico de hexosaminidase na presença de um indutor da enzima leva à coloração azul das colónias de *C. albicans*. A eventual hidrólise de um segundo substrato permite diferenciar as culturas mistas e orientar a identificação para outras espécies. As colónias que hidrolizam este substrato são pigmentadas de rosa. A mistura de antibióticos permite inibir o crescimento da maior parte das bactérias.

Gelose Chapman 2 (MSA2)

Objectivo

A gelose Chapman 2 (meio gelose manitol salgado) é um meio que se destina ao isolamento selectivo dos estafilococos.

Fundamento

Os microrganismos que fermentam o manitol originam colónias amarelas. Esta característica é um critério de orientação para a identificação de *Staphylococcus aureus*. O teor elevado em cloreto de sódio do meio limita o desenvolvimento de outras bactérias.

Gelose CPS ID 3 (CPS3)

Objectivo

A gelose CPS ID 3 é um meio de isolamento e de identificação que se destina às uroculturas. Permite efectuar:

- a contagem microbiana da amostra mediante um método de sementeira padronizado
- a identificação dos seguintes grupos bacterianos:
 - *Escherichia coli*

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- *Enterococcus*
- *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* (KESC)
- *Proteus - Providencia - Morganella*

Esta gelose é uma evolução da gelose CPS ID 2 (Biomérieux - Ref. 43 211) que permite uma detecção espontânea da desaminase dos *Proteus - Providencia - Morganella* e um melhor crescimento das bactérias Gram (+) e das leveduras.

Fundamento

A gelose CPS ID 3 é constituída por uma base nutritiva rica que associa diferentes peptonas e 2 substratos cromogénicos que permitem revelar a actividade enzimática correspondente. A revelação do indol é favorecida pela incorporação de triptofano na gelose. A concentração elevada em agar evita a invasão da gelose pelo *Proteus*. A identificação directa das bactérias mais frequentemente isoladas nas infecções urinárias baseia-se no princípio seguinte:

- *E. coli* : coloração espontânea (rosa a vermelho escuro) das estirpes produtoras de β -glucuronidase
- *Enterococcus*: coloração espontânea turquesa das estirpes produtoras de β -glucosidase
- KESC: coloração espontânea verde a castanho-esverdeado das estirpes produtoras de β -glucosidase
- *Proteus - Providencia - Morganella*: coloração espontânea castanho escuro a castanho das estirpes produtoras de desaminase

Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAEM2)

Objectivo

A gelose Chocolate Haemophilus 2 é um meio selectivo para o isolamento das diferentes espécies de *Haemophilus* a partir de colheitas polimicrobianas.

Fundamento

O isolamento de *Haemophilus* a partir de produtos patológicos provenientes das vias respiratórias ou genitais é frequentemente difícil devido à presença de uma flora associada importante. A gelose Chocolate Haemophilus 2 é composta por uma base nutritiva enriquecida

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

em factores X (hemina) e V (NAD). A selectividade é obtida pela associação de antibióticos e de antifúngicos que permitem inibir a maioria das bactérias Gram (+) e das leveduras.

Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)

Objectivo

Meio enriquecido, não selectivo obtido a partir da gelose Columbia, pelo aquecimento da mistura com sangue a 80°C (hemólise dos eritrócitos). Favorece o crescimento de *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp.

Fundamento

Esta é composta por uma base nutritiva enriquecida em factores X (hemina) e V (NAD).

3. TESTES DE IDENTIFICAÇÃO

3.1 Introdução

Após o isolamento de um microrganismo, interessa proceder à sua caracterização. A decisão do modo de processamento do exame cultural e valorização clínica das estirpes isoladas baseia-se na compreensão da patogenia da infecção nos diferentes locais anatómicos.

Os testes de identificação disponíveis neste Laboratório são os seguintes:

- Pesquisa de catalase
- Teste da oxidase (Biomérieux – Ref. 55 635)
- Slidex Staph Plus (Biomérieux – Ref. 73 115)
- Slidex Strepto A (Biomérieux – Ref. 58 815)
- Slidex Strepto B (Biomérieux – Ref. 58 816)
- Slidex Strepto D (Biomérieux – Ref. 58 817)
- Slidex pneumo-Kit (Biomérieux – Ref. 58 821)
- ID indol TDA (Biomérieux – Ref. 56 541)

3.2 Testes de identificação

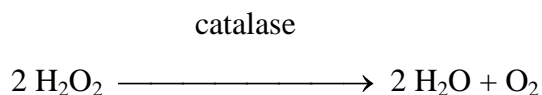
Pesquisa de catalase

Objectivo

A pesquisa da enzima catalase em colónias bacterianas isoladas em meio de cultura é utilizada na identificação de cocos Gram (+), nomeadamente para fazer a distinção entre estafilococos e estreptococos.

Fundamento

As bactérias que possuem a enzima catalase no seu sistema enzimático têm a capacidade de destruir peróxidos formados no decurso de reacções de oxidação, através da reacção:



RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Se após contacto da colónia em estudo com o peróxido de hidrogénio (3%), ocorrer efervescência (libertação de O₂) – a pesquisa de catalase é positiva; se não ocorrer efervescência (não há libertação de O₂) – a pesquisa de catalase é negativa.

Os estafilococos são catalase positivos enquanto que os estreptococos são catalase negativos.

Limites e precauções

Culturas com mais de 24 horas podem dar falsos negativos. Devido à existência de catalase nos eritrócitos, a prova deve ser interpretada com muito cuidado quando efectuada a partir de colónias retiradas de meios contendo sangue (possibilidade de falso positivo).

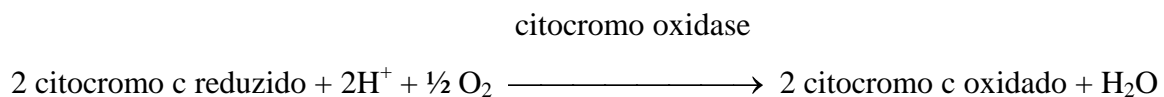
Teste da oxidase

Objectivo

A enzima citocromo oxidase é produzida por vários microrganismos incluindo espécies de *Neisseria* e *Pseudomonas* pelo que o teste da oxidase é muito utilizado na identificação presuntiva de culturas microbianas.

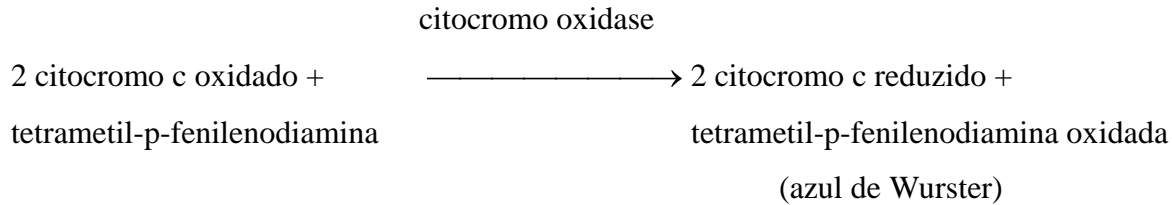
Fundamento

O teste da oxidase permite pesquisar a enzima citocromo oxidase que cataliza o último passo da cadeia respiratória. As bactérias aeróbias estritas são oxidase positivas, enquanto que as bactérias aeróbias anaeróbias facultativas são oxidase negativas.



O teste da oxidase é realizado recorrendo ao composto tetrametil-p-fenilenodiamina que na presença da citocromo oxidase é oxidado pelo citocromo c a um composto de cor púrpura designado por azul de Wurster.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA



As colónias com bactérias que contenham a actividade da enzima desenvolvem uma cor azul-roxo escura em mais ou menos 10 segundos.

Limitação

Não devem ser usadas ansas de metal pois os produtos de oxidação do metal, que se formam aquando do aquecimento da ansa, podem provocar falsa reacção positiva.

Slidex Staph Plus

Objectivo

O Slidex Staph Plus é um teste rápido de aglutinação de partículas de látex para a identificação de *Staphylococcus aureus* a partir dos meios de isolamento.

Fundamento

Os estafilococos fazem parte das bactérias que se encontram com mais frequência em patologia humana. As infecções mais frequentes são ligeiras e localizadas na pele e tecido celular subcutâneo, onde o *S. aureus* provoca furúnculo, celulite, abscessos ou infecções de queimaduras e de feridas, traumáticas ou cirúrgicas. Ocasionalmente, a partir destas infecções ou de locais da pele ou mucosas colonizados pelo microrganismo, pode haver disseminação directa para tecidos vizinhos. Pode também ocorrer bacterémias, com possíveis localizações secundárias em qualquer local, surgindo por vezes infecções graves, como endocardites, osteomielites, artrites, pneumonias, pielonefrites, meningites ou septicemias.

O método que foi durante mais tempo utilizado para a identificação de *Staphylococcus aureus* foi a detecção da coagulase. Este teste baseia-se na capacidade das estirpes de *Staphylococcus aureus* produzirem esta enzima extracelular que coagula o plasma. Este teste permite diferenciar *Staphylococcus aureus* das outras espécies de estafilococos, maioritariamente coagulase

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

negativa. No entanto, este método necessita de 4 a 24 horas de incubação. Outros métodos mais recentes (testes de aglutinação em lâmina) baseiam-se na detecção do factor de afinidade do fibrinogénio (clumping factor) e da proteína A. No entanto, estes testes demonstraram falta de sensibilidade em relação a algumas estirpes resistentes à meticilina (MRSA). Efectivamente, para algumas estirpes MRSA, a proteína A e o clumping factor podem ser expressas em baixa quantidade. O Slidex Staph Plus permite detectar com uma grande sensibilidade estas estirpes, graças à utilização de anticorpos monoclonais dirigidos a estruturas periféricas específicas de *Staphylococcus aureus*.

O reagente Slidex Staph Plus engloba partículas de látex azul sensibilizadas com fibrinogénio humano e anticorpos monoclonais. Permite, portanto, a detecção simultânea:

- do factor de afinidade para o fibrinogénio (clumping factor)
- da proteína A pelo fragmento Fc das IgG de rato
- de um antígeno específico ligado às estruturas periféricas de *S. aureus*

Na presença de colónias de *Staphylococcus aureus*, pode observar-se uma aglutinação visível a olho nú.

Slidex Strepto A, B e D

Objectivo

O Slidex Strepto é um teste rápido de aglutinação de partículas de látex para o agrupamento dos estreptococos dos grupos de Lancefield. Este teste permite uma identificação rápida e fácil das colónias de estreptococos a partir de meios de isolamento.

Fundamento

Os estreptococos contêm frequentemente antígenos específicos de grupo que podem ser extraídos e identificados com anti-soros. Assim, os reagentes constituídos por partículas de látex sensibilizadas com anticorpos dirigidos contra os antígenos fixam-se aos antígenos correspondentes, produzindo uma aglutinação visível das partículas de látex.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Após cultura em gelose de sangue, as colónias isoladas de estreptococos são colocadas num tubo que contem o reagente de extracção. O antigénio específico do grupo contido na parede é extraído, de forma enzimática, através de uma técnica simples e rápida. O antigénio extraído é identificado pelas partículas de látex sensibilizadas com um anticorpo anti-antigénio de grupo dos estreptococos. Se o antigénio estiver presente, o reagente látex correspondente é aglutinado. Se o antigénio estiver ausente, o reagente látex permanece em suspensão homogénea.

Slidex pneumo-Kit

Objectivo

O Slidex pneumo-Kit é um teste rápido de aglutinação de partículas de látex para a identificação de *Streptococcus pneumoniae* a partir dos meios de isolamento.

Fundamento

O *Streptococcus pneumoniae* é um habitante normal das vias respiratórias superiores, onde pode viver como comensal (40-70% dos indivíduos) mas podendo também causar pneumonia, sinusite, otite, bronquite, bacteriemia e meningite.

O *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria em que o antigénio capsular permite distinguir um grande número de serotipos (82 serotipos segundo E. Lund). As partículas de látex são sensibilizadas por anticorpos que cobrem o conjunto dos serotipos e permitem identificar *Streptococcus pneumoniae* através de uma reacção de aglutinação.

Os antigénios capsulares são identificados por partículas de látex sensibilizadas por anticorpos anti-antigénio *Streptococcus pneumoniae*. Se um antigénio estiver presente o reagente de látex é aglutinado. Se os antigénios não estiverem presentes, o reagente de látex mantém-se em suspensão homogénea.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

ID indol TDA

Objectivo

O ID indol TDA permite detectar nas enterobactérias a presença de uma triptofano desaminase (TDA), assim como a produção de indol. Permite assim a diferenciação presuntiva das bactérias que possuem estas características.

Fundamento

Detecção da presença de TDA

A partir de colónias isoladas em meios contendo triptofano (ex. CPS ID 2), as bactérias possuindo triptofano desaminase (TDA) degradam o triptofano libertando ácido indol-pirúvico. Esta reacção é revelada pelo aparecimento de uma coloração castanha após adição de uma solução de perclorato de ferro.

TDA

Triptofano —————→ ácido indol-pirúvico

Detecção da produção de indol

Algumas bactérias desaminam e hidrolizam o triptofano com obtenção de indol e ácido pirúvico. Esta reacção é revelada pelo aparecimento de uma coloração azul após adição de um reagente contendo dimetilaminocinamaldeído e ácido clorídrico.

TDA

Triptofano —————→ ácido indol-pirúvico

hidrólise

ácido indol-pirúvico —————→ indol + ácido pirúvico + amónia

4. TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

4.1 Introdução

O teste de sensibilidade aos antibióticos deve realizar-se para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, sempre que a susceptibilidade não puder ser previsível pelo conhecimento da identidade do microrganismo. Os testes de susceptibilidade estão principalmente indicados quando o microrganismo pertence a uma espécie capaz de exibir resistência aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados.

Existem várias técnicas para determinar a sensibilidade aos antibióticos, mas, na essência, baseiam-se todas na determinação da capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar *in vitro*, na presença de diferentes fármacos.

Os antibiogramas utilizados neste Laboratório são os seguintes:

- ATB STAPH 5 (Biomérieux - Ref. 14 325)
- ATB UR 5 (Biomérieux - Ref. 14 335)
- ATB PSE 5 (Biomérieux - Ref. 14 345)
- ATB STREP 5 (Biomérieux - Ref. 14 355)

4.2 Teste de sensibilidade aos antibióticos

Objectivo

As galerias ATB permitem determinar a sensibilidade de determinadas bactérias aos antibióticos em meio semi-sólido em condições muito próximas das técnicas de referência segundo recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS):

- ATB STAPH 5: Estafilococos
- ATB UR 5: Enterobactérias urinárias
- ATB PSE 5: *Pseudomonas* e outros bacilos Gram (-) não fermentadores
- ATB STREP 5: Estreptococos.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Fundamento

As galerias ATB contêm 16 pares de cúpulas. O primeiro par, sem antibiótico, serve de padrão de crescimento. Os pares seguintes contêm antibióticos com uma ou duas concentrações (c e C).

A bactéria a testar é colocada em suspensão e depois transferida para o meio de cultura e inoculada na galeria. Após incubação, a leitura do crescimento é efectuada visualmente. O resultado obtido permite classificar a estirpe como Sensível, Intermédia ou Resistente.

Leitura e interpretação

Detectar em cada cúpula a presença de uma turvação (+) por leitura visual.

Para os antibióticos testados com duas concentrações:

Aspecto da cúpula		Resultado		Estirpe	
c	C	c	C		
claro	claro	-	-	S	SENSÍVEL
turvo	claro	+	-	I	INTERMÉDIA
turvo	turvo	+	+	R	RESISTENTE

Para os antibióticos testados com uma única concentração:

Aspecto da cúpula	Resultado	Estirpe	
claro	-	S	SENSÍVEL
turvo	+	R	RESISTENTE

5. MARCHA GERAL DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS

Produtos biológicos analisados neste Laboratório:

- Urina
- Exsudado vaginal
- Exsudado uretral
- Exsudado nasal
- Exsudado faríngeo
- Expectoração
- Exsudado purulento
- Fezes

5.1 Urocultura

Introdução

As infecções do aparelho urinário são das infecções mais frequentes no Homem. A infecção urinária aguda é geralmente causada por bactérias da flora intestinal saprófita, que invade o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. Os agentes etiológicos mais frequentes nas crianças e adultos, sem outras doenças associadas, são as Enterobactérias com grande destaque para a *Escherichia coli*.

Colheita e transporte

Na colheita por micção o doente deverá colher a primeira urina da manhã ou, se impossível, colher urina após ter estado pelo menos duas horas sem urinar. Técnica:

1. Afastamento dos grandes lábios ou prepúcio.
2. Limpeza metódica do meato uretral com gaze embebida em água e sabão.
3. Usando o mesmo processo, lavar só com água e secar.
4. Recolha do jacto médio directamente para recipiente esterilizado após desperdiçar a primeira porção do jacto urinário.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Após a colheita, a urina deve ser transportada ao laboratório o mais rapidamente possível uma vez que deverá ser semeada até uma hora após a colheita. Se não for possível, deverá ser refrigerada a 4°C e processada até às 24 horas após a colheita.

Exame a fresco

Pesquisa de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, bactérias, elementos leveduriformes e parasitas no sedimento urinário.

Exame após coloração

Coloração de Gram.

Exame cultural

Meio de cultura

Gelose CPS ID 3 (CPS3).

Inoculação

O meio é semeado directamente a partir da urina. A amostra é semeada com uma ansa calibrada de 10 µl, da seguinte forma:

1. Homogeneizar a urina.
2. Imergir na vertical a ansa na urina.
3. Descarregar a ansa efectuando uma estria num raio da placa (verificar se a gota foi colocada correctamente).
4. Fazer estrias perpendiculares muito apertadas em toda a superfície da placa.

Incubação

37°C/18 a 24 horas.

Contagem

Após incubação observar o crescimento bacteriano. O cálculo da concentração bacteriana é efectuado tendo em conta a densidade das colónias presentes na placa:

- Número de bactérias/ml $< 10^4 \Rightarrow$ Contaminação provável

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- Número de bactérias/ml $> 10^4$ e $< 10^5 \Rightarrow$ Exame duvidoso, repetir com nova colheita
- Número de bactérias/ml $> 10^5 \Rightarrow$ Infecção provável.

Nota - As infecções urinárias com mais de uma espécie são pouco frequentes, por isso o seu aparecimento poderá significar contaminação.

Identificação

- Colónias de cor rosa a vermelha escura ou translúcidas com centro rosa a vermelho escuro: *Escherichia coli*.
- Colónias de cor azul turquesa e observação de cocos Gram (+) no exame directo: *Enterococcus*. Se uma destas condições não for preenchida, a identificação do microrganismo isolado deve ser efectuada com testes complementares.
- Colónias de cor verde a castanho-esverdeado e observação de bacilos Gram (-) no exame directo: grupo KESC.
- Coloração castanho escuro a castanho das colónias ou do tapete bacteriano: efectuar uma pesquisa do indol colocando sobre uma colónia uma gota do reagente contendo dimetilaminocinamaldeído e ácido clorídrico da embalagem ID indol TDA. Notar a coloração obtida após alguns segundos:
 - Coloração azul = indol (+) – *Proteus* indologénico, *Providencia* ou *Morganella*.
 - Ausência de coloração azul = indol (-) – *Proteus mirabilis*. Confirmar pelo teste da oxidase que é negativo para os *Proteus*.
- Colónias violetas – Presunção de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo β -hemolítico do grupo B).
- Colónias pigmentadas – Presunção de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Colónias amarelas – Presunção de *Staphylococcus aureus*.
- Colónias de outras cores – A identificação do microrganismo isolado deve ser seguida de testes complementares.

Teste de sensibilidade aos antibióticos

No caso de uma cultura positiva, a escolha do antibiograma a realizar é feita em função do microrganismo isolado.

5.2 Exsudado vaginal

Colheita e transporte

Fazer a colheita com espéculo sem lubrificante ou humedecido com soro fisiológico estéril. Colher o exsudado das paredes vaginais com zaragatoa.

- Zaragatoa estéril em meio com carvão para o exame cultural
- Zaragatoa estéril seca para o exame microscópico
- Zaragatoa estéril seca para pesquisa de estreptococos do grupo B em grávidas

Nota - O carvão é inibidor dos produtos do metabolismo tóxicos para a *Neisseria gonorrhoeae*.

Exame a fresco

A zaragatoa seca é embebida em soro fisiológico e colocada na estufa a 37°C/30 minutos. Após este período observa-se uma gota ao microscópico para a pesquisa de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, bactérias, elementos leveduriformes e *Trichomonas vaginalis*.

O exame essencial para o diagnóstico de uma infecção por *Trichomonas vaginalis* é o exame a fresco que permite observar a mobilidade dos parasitas.

Exame após coloração

Pesquisa de bacilos de Doderlein, outras bactérias e “clue cells” após coloração de Gram.

A preparação a fresco pode indicar a existência de “clue cells” sugestivo de vaginose bacteriana por *Gardnerella vaginalis*. No entanto, na coloração de Gram, estas células vêem-se melhor - células epiteliais recobertas de bactérias com Gram variável.

Exame cultural

Meios de cultura

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)
- Gelose Candida ID 2 (CAN 2)
- Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- Caldo Todd-Hewitt + Antibióticos (TODD H-T) em grávidas

Inoculação

A sementeira é feita por estrias. A inoculação por estrias é realizada com a finalidade de obter colónias isoladas e realiza-se com uma ansa à superfície do meio sólido.

Incubação

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro \Rightarrow 37°C com observação às 24 e 48 horas.
- Gelose Candida ID 2 \Rightarrow 37°C com observação às 24 e 48 horas.
- Gelose Chocolate PolyViteX PVX \Rightarrow 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Examinar as culturas após 24 horas de incubação. Se não houver crescimento, incubar novamente as placas por mais 24 horas renovando a atmosfera enriquecida em CO₂. Esta atmosfera é obtida colocando as placas num frasco com tampa hermética e dentro do qual se acende uma vela normal. As velas coloridas não são aconselháveis por poderem libertar substâncias tóxicas para as bactérias, inibindo o seu crescimento.
- Caldo Todd-Hewitt + Antibióticos \Rightarrow 37°C/24 horas e subcultura para gelose sangue.

Identificação

Após incubação observar o crescimento bacteriano:

- Gelose sangue após enriquecimento em caldo Todd-Hewitt

Pesquisa de estreptococos do grupo B de Lancefield em grávidas \Rightarrow Observação de hemólise β (zona clara à volta da colónia ou por baixo da colónia). Completar a identificação com a pesquisa de catalase e o Slidex Strepto B.

- Gelose Candida ID 2
 - Colónias azul pálido a azul escuro: característico de *C. albicans*.
 - Colónias rosa: característico de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr*.
 - Colónias branco creme: sem valor preditivo.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- Gelose Chocolate PolyViteX VCAT3

Pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* ⇒ colónias pequenas e geralmente transparentes a partir das 24 horas de incubação. Com o prolongamento da incubação as colónias têm tendência a tornar-se mais opacas e maiores. A coloração de Gram revela diplococos Gram (-) de morfologia característica e o teste da oxidase é positivo.

5.3 Exsudado uretral

Colheita e transporte

Se possível fazer a colheita do exsudado uretral antes da primeira micção. Se não é possível, esperar pelo menos uma hora após a última micção. Limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gaze esterilizada e introduzir uma zaragatoa fina e flexível com um movimento de rotação cerca de 1 cm dentro da uretra.

- Zaragatoa estéril em meio com carvão para o exame cultural
- Zaragatoa estéril seca para o exame microscópico

Nota - O carvão é inibidor dos produtos do metabolismo tóxicos para a *Neisseria gonorrhoeae*.

Exame a fresco

A zaragatoa seca é embebida em soro fisiológico e colocada na estufa a 37°C/30 minutos. Após este período observa-se uma gota ao microscópico para a pesquisa de células, leucócitos, eritrócitos, bactérias, elementos leveduriformes e *Trichomonas vaginalis*.

O exame essencial para o diagnóstico de uma infecção por *Trichomonas vaginalis* é o exame a fresco que permite observar a mobilidade dos parasitas.

Exame após coloração

Coloração de Gram.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Exame cultural

Meios de cultura

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)
- Gelose Candida ID 2 (CAN2)
- Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)

Inoculação

A sementeira é feita por estrias. A inoculação por estrias é realizada com a finalidade de obter colónias isoladas e realiza-se com uma ansa à superfície do meio sólido.

Incubação

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro $\Rightarrow 37^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$ com observação às 24 e 48 horas.
- Gelose Candida ID 2 $\Rightarrow 37^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$ com observação às 24 e 48 horas.
- Gelose Chocolate PolyViteX $\Rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ em atmosfera com 5% de CO_2 . Examinar as culturas após 24 horas de incubação. Se não houver crescimento, incubar novamente as placas por mais 24 horas renovando a atmosfera enriquecida em CO_2 . Esta atmosfera é obtida colocando as placas num frasco com tampa hermética e dentro do qual se acende uma vela normal. As velas coloridas não são aconselháveis por poderem libertar substâncias tóxicas para as bactérias, inibindo o seu crescimento.

Identificação

Após incubação observar o crescimento bacteriano:

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro
Anotar a presença eventual de hemólises características. A identificação do ou dos microrganismos isolados deve ser seguida de testes complementares.
- Gelose Candida ID 2
Colónias azul pálido a azul escuro: característico de *C. albicans*.
Colónias rosa: característico de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. Kefyr*.
Colónias branco creme: sem valor preditivo.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- Gelose Chocolate PolyViteX

Pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* ⇒ colônias pequenas e geralmente transparentes a partir das 24 horas de incubação. Com o prolongamento da incubação as colônias têm tendência a tornar-se mais opacas e maiores. A coloração de Gram revela diplococos Gram (-) de morfologia característica e o teste da oxidase é positivo.

5.4 Exsudado nasal

Colheita e transporte

Colheita do exsudado nasal inserindo uma zaragatoa em cada narina até encontrar resistência e fazendo-a rodar suavemente contra a mucosa nasal.

- Zaragatoa estéril em meio de transporte para o exame cultural
- Zaragatoa estéril seca para o exame microscópico

Exame após coloração

Pesquisa de células epiteliais, leucócitos e bactérias na coloração de Gram.

Exame cultural

Meios de cultura

- Gelose Chapman 2(MSA2)
- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS).

Inoculação

A sementeira é feita por estrias. A inoculação por estrias é realizada com a finalidade de obter colônias isoladas e realiza-se com uma ansa à superfície do meio sólido.

Incubação

37°C/24 horas.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Identificação

Após incubação observar o crescimento bacteriano:

- Gelose Chapman

Pesquisa de *Staphylococcus aureus* ⇒ As colónias de *S. aureus* que fermentam o manitol são amarelas e associadas a uma descoloração amarela em redor da colónia que difunde no meio. Completar a identificação com o Slidex Staph Plus.

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

Anotar a presença eventual de hemólises características. A identificação do ou dos microrganismos isolados deve ser seguida de testes complementares.

Teste de sensibilidade aos antibióticos

No caso de uma cultura positiva, a escolha do antibiograma a realizar é feita em função do microrganismo isolado.

5.5 Exsudado faríngeo

Introdução

A principal causa de faringite é viral. Na faringite bacteriana a principal causa é o *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A.

Colheita e transporte

Deprimir a língua com uma espátula e colher a amostra passando vigorosamente a zaragatoa ao nível das amígdalas e porção posterior da faringe, evitando tocar a língua e a úvula.

- Zaragatoa estéril em meio de transporte para o exame cultural
- Zaragatoa estéril seca para o exame microscópico.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Exame directo

Não se recomenda no diagnóstico da faringite estreptocócica, devido à existência de uma flora mista e de um grande número de outros estreptococos na orofaringe, sendo por isso difícil a sua interpretação.

Exame cultural

Meio de cultura

Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS).

Inoculação

A sementeira é feita por estrias. A inoculação por estrias é realizada com a finalidade de obter colónias isoladas e realiza-se com uma ansa à superfície do meio sólido.

Incubação

37°C/24 horas.

Identificação

Pesquisa de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo β -hemolítico do grupo A de Lancefield) \Rightarrow Observação de hemólise β (zona clara à volta da colónia ou por baixo da colónia). Completar a identificação com a pesquisa de catalase e o Slidex Strepto A.

5.6 Expectoração

Colheita e transporte

Se possível, colher a primeira expectoração da manhã. Antes da colheita lavar a boca e gargarejar só com água. Instruir o doente para colher expectoração por tosse profunda e desprezar amostras de saliva ou rinorreia posterior. Colocar a amostra em recipiente estéril, seco, de boca larga e tampa de rosca.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Exame após coloração

Seleccionar uma porção purulenta da amostra, efectuar um esfregaço por estiramento e corar pelo método de Gram.

Exame cultural

Principais microrganismos pesquisados

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*
- Género *Proteus*
- Género *Haemophilus*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Cândida sp.*

Meios de cultura

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)
- Gelose Mac Conkey (MCK)
- Gelose Candida ID 2 (CAN 2)
- Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2).

Inoculação

A sementeira é feita por estrias. A inoculação por estrias é realizada com a finalidade de obter colónias isoladas e realiza-se com uma ansa à superfície do meio sólido.

Incubação

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro ⇒ 37°C/24 horas
- Gelose Mac Conkey (MCK) ⇒ 37°C/24 horas
- Gelose Candida ID 2 (CAN2) ⇒ 37°C/48 horas

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

- Gelose Chocolate Haemophilus (HAE2) \Rightarrow 37°C/24 horas em atmosfera com 5% de CO₂. Esta atmosfera é obtida colocando as placas num frasco com tampa hermética e dentro do qual se acende uma vela normal. As velas coloridas não são aconselháveis por poderem libertar substâncias tóxicas para as bactérias, inibindo o seu crescimento.

Identificação

Após incubação observar o crescimento bacteriano e completar a identificação do ou dos microrganismos isolados com testes complementares.

Teste de sensibilidade aos antibióticos

No caso de uma cultura positiva, a escolha do antibiograma a realizar é feita em função do microrganismo isolado.

5.7 Exsudado purulento

Colheita e transporte

Todas as amostras têm de ser identificadas com os dados demográficos do doente, data e hora da colheita, identificação do produto e local anatómico da colheita. O transporte ao laboratório e respectivo processamento deve ser o mais rápido possível. As amostras que não são transportadas rapidamente ao laboratório que estejam contaminadas com flora mista da pele ou que contenham microrganismos de colonização, conduzem a falsos resultados com o consequente diagnóstico clínico e respectiva terapêutica incorrectos.

- Zaragatoa estéril em meio de transporte para o exame cultural
- Zaragatoa estéril seca para o exame microscópico

Exame após coloração

Coloração de Gram.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Exame cultural

Meios de cultura

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)
- Gelose Mac Conkey (MCK)
- Gelose Chapman 2 (MSA2)
- Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2)

Inoculação

A sementeira é feita por estrias. A inoculação por estrias é realizada com a finalidade de obter colónias isoladas e realiza-se com uma ansa à superfície do meio sólido.

Incubação

Incubação a 37°C, aerobiose, 18-24 horas.

Identificação

Após incubação observar o crescimento bacteriano e completar a identificação do ou dos microrganismos isolados com testes complementares.

Teste de sensibilidade aos antibióticos

No caso de uma cultura positiva, a escolha do antibiograma a realizar é feita em função do microrganismo isolado.

5.8 Coprocultura

Colheita

Despiste por rotina de *Salmonella* spp e *Shigela* spp. Colher as fezes para um recipiente esterilizado. Embora tradicionalmente seja aconselhado a colheita até um total de 3 amostras de dejeções diferentes, nos casos agudos uma amostra é quase sempre suficiente.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Exame macroscópico

Observar a consistência das fezes e a presença de muco, pús ou sangue.

Exame cultural

Meios de cultura

- Caldo Selenito F (SELENITO F-T)
- Gelose SS (SS)

Inoculação e incubação

Semear as fezes directamente no caldo Selenito F e agitar para homogeneizar. Incubar os tubos na estufa a 37°C/6-12 horas. Após este período repicar para Gelose SS e incubar novamente a 37°C/24 horas.

Identificação

Após incubação observar o crescimento bacteriano:

- Gelose SS
 - Pesquisa de colónias de *Salmonella* - incolores ou amarelas pálidas com ou sem centro negro.
 - Pesquisa de colónias de *Shigella* - incolores, rosas pálidas ou alaranjadas sem centro negro.

5.9 Exame parasitológico das fezes

Colheita

Colher 3 amostras em dias sucessivos, de preferência em dias alternados. Colher as amostras de fezes para recipiente limpo e seco.

Exame macroscópico

Observar a consistência das fezes e a presença de muco, pús, sangue ou parasitas.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Exame a fresco

Fazer uma suspensão de fezes em soro fisiológico e observar uma gota ao microscópio.

Exame após concentração

Método

Método de concentração pelo formol-éter (método de Ritchie).

Objectivo

Concentrar as formas parasitárias presentes nas fezes de modo a facilitar a sua pesquisa.

Fundamento

É um método baseado na diferença de peso existente entre as formas parasitárias e o material fecal. As formas parasitárias são concentradas no sedimento por centrifugação enquanto as partículas grandes ficam retidas no filtro e as gorduras são separadas por flutuação na camada do éter.

Em geral, este método permite uma boa recuperação das formas parasitárias. A principal desvantagem do método consiste no facto de se usar éter que pode representar um perigo quer durante a sua utilização quer durante o seu armazenamento.

Técnica

1. Retirar uma porção de fezes com um diâmetro aproximado de 1 cm e dissolver em 10-12 ml de soro fisiológico.
2. Num pequeno funil filtrar através de gaze aproximadamente 10 ml de suspensão para um tubo de centrífuga.
3. Centrifugar o tubo contendo a suspensão das fezes (1000-1200 rpm durante 3 a 5 minutos), desprezando o sobrenadante.
4. Ressuspender o sedimento em soro fisiológico e centrifugar novamente.
5. Repetir os pontos 3 e 4 até obtenção de um sobrenadante límpido.
6. Adicionar ao sedimento 10 ml de formalina a 10%. Agitar cuidadosamente e deixar repousar durante 10 minutos.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

7. Adicionar 3 ml de éter e agitar fortemente.
8. Centrifugar a mistura anterior (800 rpm durante 2 minutos). Formam-se quatro camadas:
 - pequena camada de sedimento contendo quistos de protozoários e ovos de helmintas;
 - uma camada de formalina;
 - um rolhão com restos fecais logo acima da camada de formalina;
 - uma última camada de éter.
9. Libertar o rolhão com uma pipeta de vidro e decantar as três camadas de cima.
10. Ressuspender o sedimento, colocar uma gota da suspensão numa lâmina, juntar outra gota de lugol e observar ao microscópio:
 - Objectiva de 10x – pesquisa de ovos (ex. *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana*, *Taenia* sp.).
 - Objectiva de 40x – pesquisa de quistos (ex. *Giardia lamblia*).

6. PESQUISAS ORIENTADAS

Em determinadas situações é solicitado pelo clínico a pesquisa de microrganismos específicos que devido ao seu difícil crescimento nos meios habituais não fazem parte dos exames bacteriológicos de rotina.

Pesquisas orientadas realizadas neste Laboratório:

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycoplasma*
- *Chlamydia*

6.1 Pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*

Amostra

A pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* é efectuada na expectoração (mais frequente) e na urina.

Colheita

Recipiente esterilizado.

Tratamento da amostra

Expectoração

O laboratório utiliza um *kit* de tratamento de expectorações para a detecção das micobactérias (Biomérieux – Ref. 42 103). Este *kit* destina-se a descontaminar (eliminar a flora comensal) e a fluidificar as expectorações com vista a favorecer a pesquisa das micobactérias.

Antes da cultura para a detecção das micobactérias, os produtos de expectoração devem ser submetidos a operações de fluidificação e de descontaminação. O método de Kubica, modificado por Krasnow, baseia-se na utilização simultânea da L-cisteína e do cloreto de benzalcónio. A L-cisteína é um agente mucolítico de acção rápida. O cloreto de benzalcónio destrói a flora

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

acompanhante sem, no entanto, inibir a cultura das micobactérias. O tampão fosfato neutraliza o pH e a albumina bovina actua como agente protector.

Urina

Concentrar a amostra. A concentração, feita por centrifugação de todo o volume de urina destina-se a aumentar a sensibilidade da microscopia e do exame cultural.

Exame após coloração

Coloração de Ziehl-Neelsen.

Exame cultural

Meio de cultura

Meio Lowenstein-Jensen (LJ-T).

Incubação

37°C/60 dias com observação semanal.

Nota - Incubar na estufa a 37°C com a tampa desenroscada, em posição inclinada, até evaporação do líquido, antes de enroscar os tubos.

Identificação

Após incubação observar o crescimento. O crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* caracteriza-se por colónias rugosas com um aspecto chamado “em couve-flor”.

6.2 Pesquisa de *Mycoplasma*

Amostra

Exsudado vaginal ou uretral.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

Colheita

Zaragatoa seca. Tendo os micoplasmas uma grande afinidade para as membranas das células das mucosas, é importante efectuar bem a raspagem da mucosa para colher o maior número de células possível.

Reagente

Mycoplasma IST 2 (Biomérieux– Ref. 42 505).

Objectivo

O Mycoplasma IST 2 é um dispositivo completo destinado ao diagnóstico dos micoplasmas urogenitais. Permite a cultura, identificação, contagem indicativa e a determinação da sensibilidade aos antibióticos de *Ureaplasma* spp. e de *Mycoplasma hominis*.

Fundamento

Os micoplasmas são organismos comensais que colonizam a mucosa do tracto urogenital. Em determinadas condições, proliferam excessivamente, podendo originar infecção. A espécie *Ureaplasma urealyticum* foi dividida em duas novas espécies designadas por *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*, as quais na galeria são pesquisadas em conjunto como *Ureaplasma* spp.

Devido ao facto de poderem estar presentes como organismos comensais ou patogénicos, o diagnóstico da infecção requer identificação e quantificação. A decisão terapêutica baseia-se no título de micoplasma e na sintomatologia do doente.

O Micoplasma IST 2 associa um caldo de cultura selectivo a uma galeria que contém 22 testes. O caldo adapta-se ao excelente crescimento dos micoplasmas (pH, substratos, associação de vários factores de crescimento). A presença de substratos específicos, ureia para o *Ureaplasma* spp. e arginina para o *M. hominis*, e de um indicador (vermelho de fenol) permite, em caso de cultura positiva, visualizar uma mudança de cor do caldo ligada a um aumento de pH. A selectividade em relação à flora de contaminação eventualmente presente na amostra é fornecida pela

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

associação de 3 antibióticos e de um antifúngico. O caldo é distribuído após sementeira na galeria.

Esta galeria permite obter simultaneamente a identificação, a contagem indicativa e a sensibilidade a 9 antibióticos.

6.3 Pesquisa de *Chlamydia*

Amostra

Esfregaço endocervical ou uretral e urina.

Colheita

- Esfregaços – Remover o excesso de muco. Inserir uma zaragatoa própria no canal endocervical ou uretral e rodar. Evitar contacto com a mucosa vaginal. Sendo a *chlamydia* uma bactéria intracelular é importante efectuar bem a raspagem da mucosa para colher o maior número de células possível. Para a colheita uretral, o doente não deve urinar pelo menos 1 hora antes da colheita.
- Urina – 1ª urina da manhã para recipiente esterilizado.

Reagente

Kit CHLAMY ChecK-1 (CoopLab).

Objectivo

O CHLAMY ChecK-1 é um teste imunocromatográfico rápido para a detecção visual do antígeno da *Chlamydia*.

Fundamento

As *chlamydias* são bactérias Gram (-) que se encontram adaptadas a uma existência intracelular nas células eucariotas do hospedeiro. Estes agentes patológicos, há muito conhecidos como a causa de tracoma que afecta milhões de pessoas no terceiro mundo, têm sido recentemente

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

reconhecidos como agentes etiológicos de várias infecções do tracto urogenital sexualmente transmitidas entre pessoas dos países desenvolvidos.

A *Chlamydia trachomatis* causa uretrite não gonocócica em homens sexualmente activos. Na mulher origina vaginite e cervicite. As complicações da infecção genital são no homem epididimite e na mulher salpingite e doença inflamatória pélvica que pode levar a esterilidade e a gravidez ectópica. Entre 20 a 40% dos recém-nascidos de mães com cervicite adquirem infecção por *chlamydia* durante a passagem pelo canal de parto, que se pode manifestar como conjutivite (15 a 20%) ou como pneumonia (10 a 20%).

Existem vários serotipos de *Chlamydia trachomatis*, os quais podem ser tipados, quer por microimunofluorescência, quer por antisoros específicos, que estão relacionados com o tipo de infecção que originam: A, B, Ba e C provocam tracoma endémico/doença ocular não sexualmente transmitida, D-K que ocasionam doença oculogenital e L1-L3 que originam linfogranuloma venéreo. Estes dois últimos tipos de infecção são sexualmente transmitidas.

Os antígenos utilizados para a identificação e diferenciação da *chlamydia* estão localizados na zona externa da célula. Estas bactérias possuem antígenos proteicos que as distinguem em *C. trachomatis* e *C. psittaci*, entre as variantes LGV e tracoma. Além disso, todas as *chlamydias* possuem um antígeno termoestável que se encontra presente em todas as fases do ciclo de desenvolvimento e que em parte se assemelha a um lipopolissacárido (LPS) característico das bactérias Gram (-).

Idealmente o diagnóstico das infecções por *chlamydia* requer o isolamento da bactéria em culturas celulares. Infelizmente, a metodologia de cultura em células é difícil, demora 3 a 6 dias, é dispendiosa e nem sempre disponível nos laboratórios comuns. O diagnóstico serológico possui um valor clínico reduzido. O CHLAMY ChecK-1 fornece assim, um teste simples e directo para a detecção do antígeno de *chlamydia*, que é ao mesmo tempo específico e rápido.

O CHLAMY ChecK-1 é um teste qualitativo rápido de imunoensaio com um só passo baseado no princípio da “sandwich” imunocromatográfica. O método utiliza uma combinação única de

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM MICROBIOLOGIA

conjugado monoclonal-composto de cor e uma fase sólida com anticorpos policlonais para selectivamente identificar o antígeno LPS da espécie de *Chlamydia trachomatis* com um alto grau de sensibilidade.

Neste teste, a amostra é primeiro tratada com um tampão de extracção para isolar *Chlamydia trachomatis* se existir. A seguir à extracção do antígeno o único passo necessário é adicionar o extracto na janela da amostra do dispositivo CHLAMY CheckK-1.

Assim que a amostra flui através do dispositivo adsorvente, o anticorpo conjugado com o composto de cor liga-se ao antígeno LPS da *chlamydia*, formando um complexo antígeno-anticorpo. O dispositivo está em contacto com a tira teste imunocromatográfica que possui uma região com anticorpo policlonal anti-*chlamydia* imobilizado na janela teste.

O complexo antígeno-anticorpo move-se por acção da capilaridade ao longo da tira formando uma banda corada proveniente da imobilização do complexo na zona teste, indicando a presença de antígenos anti-*chlamydia* no extracto. Se os antígenos não se encontram presentes a janela teste permanece sem qualquer banda de cor.

O CHLAMY CheckK-1 fornece igualmente um controlo integrado no dispositivo. O aparecimento de uma segunda banda de coloração rosa na janela controlo, formada pela imobilização do excesso de complexo pela zona de anticorpo localizada na janela de controlo, demonstra que o teste foi executado correctamente.

AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A avaliação externa da qualidade também denominada avaliação de proficiência, avaliação do desempenho ou controlo de qualidade externo, consiste na avaliação do desempenho do Laboratório de Microbiologia através da análise dos resultados obtidos/emitidos nos exames de material de controlo, realizados da forma e nas condições habituais de funcionamento.

Na prática, a avaliação externa da qualidade consiste num sistema em que amostras de conteúdo conhecido mas não revelado (amostras fictícias), são introduzidas no laboratório por uma entidade externa para serem examinadas exactamente da mesma forma que são examinadas na prática habitual do laboratório as amostras semelhantes dos doentes/utentes. Os resultados obtidos são depois comparados com os resultados esperados e estatisticamente tratados pela entidade organizadora.

Este Laboratório de Microbiologia participa em dois programas de avaliação externa da qualidade:

- Bacteriologia - *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (NEQAS)
- Parasitologia - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA)

Periodicamente os resultados são avaliados e discutidos em reuniões de Serviço com os responsáveis e todos os colaboradores envolvidos, sendo estes resultados os parâmetros fundamentais para avaliação do desempenho e do funcionamento dos serviços e considerados como referências nas auditorias internas e externas do Laboratório.

CONCLUSÃO

O Estágio no Laboratório de Microbiologia do Laboratório Médico Dr.^a Quintino Rogado foi uma experiência profissional muito enriquecedora. Durante a minha permanência pude consolidar os conhecimentos adquiridos na minha actividade anterior e complementá-los com novas aprendizagens.

No período em que decorreu o estágio tive a possibilidade de manipular os vários produtos biológicos ao longo da sua marcha laboratorial, incluindo o exame macroscópico e microscópico, selecção dos meios de cultura, sementeira, isolamento, identificação e teste de sensibilidade aos antibióticos.

Para além da forte componente prática que o estágio inclui adquiri também conhecimentos teóricos sobre os microrganismos importantes em patologia humana – características morfológicas e funcionais, ciclos de vida, transmissibilidade, patogenia, epidemiologia, terapêutica, etc. e conhecimentos sobre a problemática da infecção – factores individuais e comunitários, relação hospedeiro-microrganismo, flora normal e sua distribuição, patogénicos obrigatórios e patogénicos facultativos (oportunistas), profilaxia da infecção, etc.

Constatee uma vez mais que o Laboratório de Microbiologia pode fornecer informação crucial para o diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas suspeitas ou confirmadas, no entanto, só o poderá fazer se as amostras forem de boa qualidade, em quantidade suficiente, colhidas adequadamente e acompanhadas por informação clínica pertinente.

Por tudo isto considero que o plano de Estágio referido na introdução foi cumprido e que os objectivos do estágio contidos no Regulamento dos estágios profissionalizantes do Mestrado em Análises Clínicas (Artigo 2º) foram atingidos, nomeadamente a integração no meio profissional e o contacto com os outros profissionais de saúde, a aplicação dos conhecimentos adquiridos num contexto de trabalho, a capacidade de trabalho multidisciplinar e em equipa e o contacto com os doentes aplicando princípios éticos e deontológicos.

2ª PARTE

**IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES
NO DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E
MONITORIZAÇÃO DAS DISCRASIAS
PLASMOCITÁRIAS**

LISTA DE ABREVIATURAS

AL – Amiloidose a cadeias leves

CLL – Cadeias leves livres

CLLd – Diferença entre as cadeias leves livres envolvidas no tumor e as não tumorais

CLLe – Cadeias leves livres envolvidas no tumor

DDCL – Doença de depósito das cadeias leves

DP – Discrasias plasmocitárias

ELP – Electroforese das proteínas

GMSI – Gamapatia monoclonal de significado indeterminado

IFX – Imunofixação

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

κ – kappa

λ – lambda

MM – Mieloma múltiplo

MMAS – Mieloma múltiplo assintomático

MMCL – Mieloma múltiplo a cadeias leves

MO – Medula óssea

Proteína-M – Proteína monoclonal

RC – Remissão completa

RCe – Remissão completa estrita

rCLL – Razão kappa/lambda

RP – Resposta parcial

sCLL – Cadeias leves livres no soro

INTRODUÇÃO

Durante 150 anos a presença de proteína de Bence Jones (cadeias leves livres – CLL) na urina foi um importante marcador de diagnóstico para o Mieloma Múltiplo, sendo por isso considerado o primeiro marcador tumoral descrito. No entanto, a técnica utilizada na sua avaliação era manifestamente rudimentar e com pouca sensibilidade, o que limitou a sua utilização e interesse. Nos últimos anos ressurgiu e alargou-se o interesse pelas CLL. O desenvolvimento de novos testes que permitem a sua quantificação no soro abriu as portas a novas abordagens aumentando a sua importância no estudo das discrasias plasmocitárias.

As discrasias plasmocitárias (DP) têm em comum a expansão de um único clone de células secretoras de imunoglobulinas e o consequente aumento dos níveis séricos de uma imunoglobulina completa ou de uma das suas fracções. Incluem um largo espectro de patologias que vão desde a frequentemente benigna gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) até ao plasmocitoma potencialmente tratável e às patologias mais agressivas que apresentam risco de vida como o Mieloma Múltiplo (MM) e a Amiloidose a cadeias leves (AL). Para qualquer uma destas entidades a avaliação do componente monoclonal circulante (imunoglobulina completa ou fracção) tem sido o pilar do diagnóstico e monitorização.

Até aos anos 90, o repertório de testes para avaliar e caracterizar estas imunoglobulinas monoclonais incluía a electroforese de proteínas, a imunoelectroforese, posteriormente substituída pela imunofixação e o doseamento por nefelometria das cadeias pesadas e leves totais das imunoglobulinas no soro. Para a maioria dos doentes com GMSI e MM, estes testes são adequados, no entanto, são insuficientes para a maioria dos doentes com AL ou com mieloma a cadeias leves ou oligosecretor, os quais escapam nesta triagem.

No início dos anos 2000 foi desenvolvido um teste para dosear as CLL no soro (1), o qual se distinguia dos anteriores por conter anticorpos policlonais capazes de reagir unicamente com os epítomos das cadeias leves que estão escondidos quando as cadeias leves e pesadas estão ligadas, mas que ficam disponíveis para formar o imunocomplexo quando aquelas estão livres. O teste permite a determinação das CLL κ , CLL λ e da razão κ/λ , sendo esta última um forte indicador

TEMA DE REVISÃO

numérico de monoclonalidade e portanto uma valiosa ferramenta para fazer a distinção entre patologias policlonais e monoclonais.

A abordagem de doentes com AL e MM não secretor foi revolucionada por este teste, já que tornou possível nestas situações a detecção e caracterização do componente monoclonal de forma simples e atempada. Estudos recentes mostram também que as CLL na altura do diagnóstico são um factor de risco independente sugerindo que a sua determinação deva ser incluída no Índice Internacional de Estadiamento para o MM. Também de particular interesse é a determinação das CLL na GMSI dado que em combinação com a concentração do componente monoclonal e a classe de imunoglobulina permite fazer uma estratificação do risco de progressão da doença e racionalizar os protocolos de monitorização destes doentes.

No contexto do diagnóstico, o doseamento de CLL no soro, juntamente com a electroforese das proteínas e a imunofixação, constituem um protocolo com excelentes níveis de sensibilidade e especificidade permitindo para a maioria das situações de DP prescindir dos testes na urina de 24 horas (excepção – AL).

Este trabalho tem como objectivo fazer uma revisão actualizada da determinação das cadeias leves livres demonstrando a sua importância no estudo das discrasias plasmocitárias considerando as três vertentes fundamentais: diagnóstico, prognóstico e monitorização.

Para melhor sistematização o tema será organizado da seguinte forma:

1. História das cadeias leves livres.
2. Biologia das cadeias leves das imunoglobulinas - estrutura, síntese, eliminação e metabolização.
3. Imunoensaio para o doseamento das cadeias leves livres.
4. Discrasias plasmocitárias.
5. Importância das cadeias leves livres no estudo das discrasias plasmocitárias - diagnóstico, prognóstico e monitorização.
6. Conclusões.

1. HISTÓRIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES

Sendo as CLL das imunoglobulinas sinónimo de proteína de Bence Jones, a história foi muito generosa com o Dr. Bence Jones, mas não o foi tanto com outros envolvidos na sua descoberta e desenvolvimento (2).

No dia 30 de Outubro de 1845, o Dr. William MacIntyre, médico no *Western General Dispensary* em Londres, foi chamado de urgência e a pedido do médico de família o Dr. Thomas Watson, para assistir o doente Thomas Alexander McBean, um respeitável comerciante de 45 anos que sofria de dores ósseas e fracturas múltiplas. Após examinar o doente, o Dr. William MacIntyre notou a presença de edemas e considerando a possibilidade de nefrose, testou a urina à procura de albumina. Para sua consternação, a proteína precipitada após o aquecimento da urina redissolvia-se de forma incomum, quando aquecida a 75°C.

Os dois médicos decidiram então enviar amostras de urina para o Hospital *St. George* dirigidas a um conceituado especialista em bioquímica. Uma nota escrita pelo Dr. Watson acompanhava a urina:

“Dear Dr Bence Jones,

The tube contains urine of very high specific gravity. When boiled it becomes highly opaque. On the addition of nitric acid, it effervesces, assumes a reddish hue, and becomes quite clear, but as it cools assumes the consistence and appearance which you see. Heat reliquifies it. What is it?”

Ao longo dos dois meses seguintes o estado do doente foi-se deteriorando, acabando este por morrer no dia 1 de Janeiro de 1846. Em 1850, o Dr. MacIntyre publicou o exame *post-mortem* e a descrição da peculiar descoberta na urina. Infelizmente para ele o Dr. Henry Bence Jones (figura 1) já tinha descrito o fenómeno em dois artigos de autor, um dos quais publicado no *The Lancet* em 1847. Nesse artigo, a proteína encontrada era designada como óxido de albumina e associada a patologia óssea. A reputação de Bence Jones estava assegurada, ele publicou mais de 40 artigos e tornou-se rico e famoso com base na sua prática clínica, palestras e observações originais.



Figura 1. Henry Bence Jones (1813-1873) (Wikipedia, the free encyclopedia [internet]. Disponível a partir de: http://en.wikipedia.org/wiki/Henry_Bence_Jones).

Em 1909 tinham sido reportados mais de 40 casos de proteinúria de Bence Jones e já se considerava que esta proteína tinha origem nos plasmócitos da medula óssea. Em 1922, Bayne-Jones e Wilson caracterizaram dois tipos de proteínas de Bence Jones ao observarem as reacções de precipitação utilizando antisoro de rato imunizado com urina de vários doentes. As proteínas foram classificadas como sendo de grau I ou grau II. No entanto, só em 1956 é que Korngold e Lapiri, utilizando a técnica de imunodifusão, mostraram que o antisoro contra os dois grupos também reagia com as imunoglobulinas do mieloma. Em homenagem às suas observações os dois tipos de proteína de Bence Jones foram denominados kappa e lambda (κ e λ). Em 1962, Edelman e Gally, mostraram que as CLL preparadas a partir de imunoglobulinas IgG monoclonais eram iguais à proteína de Bence Jones. Passaram 117 anos desde a primeira observação até ser finalmente determinada a natureza e função da proteína de Bence Jones. Notavelmente, o teste na urina permaneceu inalterado pelo mesmo período de tempo.

Em paralelo com as observações clínicas e científicas do papel da proteína de Bence Jones entraram na rotina dos laboratórios clínicos as técnicas de electroforese para separação de proteínas. Em 1939, Longsworth *et al.* reconheceram picos com base estreita na electroforese do soro de doentes com Mieloma Múltiplo. A electroforese foi sendo aperfeiçoada, primeiro através da utilização do papel como substrato, seguido de acetato de celulose e agarose nos anos 50 e 60. Seguiram-se as técnicas de imunolectroforese e nos anos 80 foi finalmente estabelecida a imunofixação nos moldes em que hoje é executada.

TEMA DE REVISÃO

A identificação clara das moléculas κ e λ foi possível com a utilização de anticorpos específicos para cada um destes subtipos de proteínas. Inicialmente foi usada a imunodifusão, seguida da imunoelectroforese em 1953, imunodifusão radial e por último nefelometria e turbidimetria. No entanto, o desenvolvimento de testes para o doseamento da proteína de Bence Jones no soro (cadeias leves livres no soro – sCLL) permaneceu inatingível devido à dificuldade dos anticorpos conseguirem distinguir entre sCLL e a grande quantidade de cadeias leves nas moléculas de imunoglobulina completa.

A primeira tentativa de dosear CLL no soro com sucesso foi em 1975. Antes de proceder à análise foi utilizada cromatografia em coluna para separar as cadeias leves livres das imunoglobulinas completas. Apesar dos resultados obtidos serem precisos e demonstrarem o uso potencial do teste no soro, eram impraticáveis para utilização na rotina. Estudos posteriores focaram-se na utilização de anticorpos dirigidos contra epítomos “escondidos” das CLL. Estes epítomos estão localizados na interface entre as cadeias leves e as cadeias pesadas das imunoglobulinas e tornam-se detectáveis quando as cadeias leves estão livres. Foram utilizados radioimunoensaios e imunoensaios enzimáticos utilizando antisoros policlonais contra as CLL em amostras de urina, mas a sua especificidade permaneceu inadequada para doseamento no soro.

A utilização de anticorpos monoclonais seria a abordagem óbvia para melhorar a especificidade, no entanto os reagentes eram difíceis de desenvolver e a sua utilização restringia-se a radioimunoensaios e imunoensaios enzimáticos. Foram feitas tentativas para desenvolver ensaios de turbidimetria e nefelometria utilizando anticorpos policlonais mas estes não conseguiam detectar concentrações normais de sCLL e as reacções cruzadas com as imunoglobulinas completas eram inaceitáveis. Em 2001, foram finalmente desenvolvidos imunoensaios com anticorpos policlonais que conseguiam dosear as CLL em quantidades normais no soro (1). A sua utilidade ficou rapidamente estabelecida quando foram detectadas CLL monoclonais no soro da maioria dos doentes diagnosticados como tendo um mieloma não secretor. Além disso, como descrito no *The Lancet*, todos os 224 doentes com mieloma múltiplo a cadeias leves (MMCL) que tiveram proteinúria de Bence Jones, também tiveram concentrações elevadas de sCLL (3).

TEMA DE REVISÃO

Estes resultados e muitos outros, como vamos ver neste trabalho, anunciam a utilização generalizada dos imunoensaios de sCLL. A longa história da proteína de Bence Jones pode estar a entrar no seu capítulo final, 165 anos depois de ter começado.

2. BIOLOGIA DAS CADEIAS LEVES DAS IMUNOGLOBULINAS

2.1 Estrutura

As imunoglobulinas são proteínas que possuem todas a mesma estrutura básica - duas cadeias peptídicas leves e duas cadeias peptídicas pesadas, que estão ligadas entre si por pontes bissulfídricas (figura 2). Na molécula de imunoglobulina são referenciadas duas regiões funcionais: a extremidade Fab, ou variável, é a região que reconhece e que se liga ao antígeno e a extremidade Fc, constante, que é responsável pela interação com outros componentes do sistema imunitário designadamente o complemento e as células CD4+. A maioria das imunoglobulinas têm função de anticorpo e são produzidas pelos linfócitos B após estimulação e diferenciação quando em presença de um antígeno.

As cadeias pesadas podem ser de cinco tipos: alfa, gama, delta, epsilon e mu, sendo as imunoglobulinas classificadas de acordo com o tipo de cadeia pesada em cinco classes: IgA, IgG, IgD, IgE e IgM respectivamente. As cadeias leves podem ser de dois tipos: kappa ou lambda. No homem são produzidas aproximadamente duas vezes mais cadeias leves κ do que cadeias λ . Cada cadeia leve é constituída por uma única cadeia polipeptídica com cerca de 220 aminoácidos.

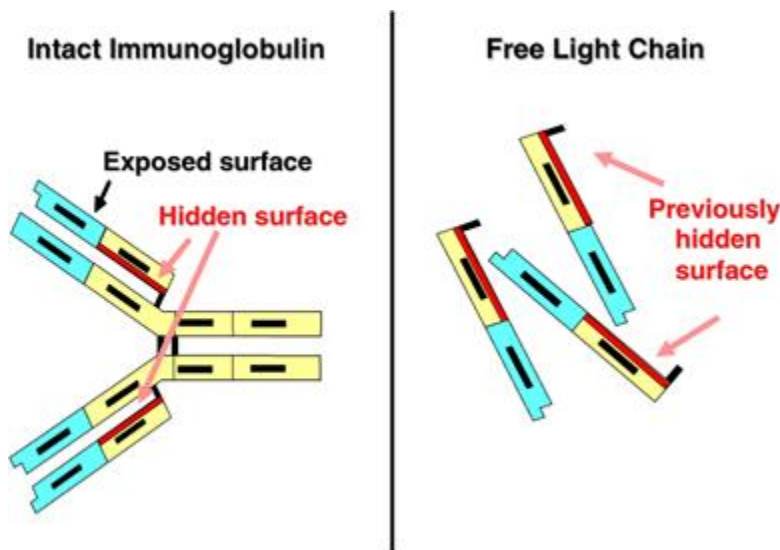


Figura 2. Representação esquemática de uma imunoglobulina completa e das cadeias leves livres (4).

TEMA DE REVISÃO

Cada molécula de cadeia leve é codificada por um domínio N-terminal que contém a região variável (V) e um domínio C-terminal (C) que contém a região constante. Estes domínios encontram-se ligados por um segmento génico (J). A maior variabilidade encontra-se nas regiões hipervariáveis (CDR) do domínio V. Os genes que codificam os anticorpos são formados nos linfócitos B pela junção de segmentos de DNA que estão muito distantes no DNA das células germinativas e outros tipos de células somáticas. Uma de cada região génica V e J no genoma está ligada a um único gene C, conseqüentemente, os genes das imunoglobulinas diferem dependendo dos domínios V e J. Com excepção de alguns aminoácidos a região constante C apresenta muito pouca variabilidade, em contraste a região variável apresenta uma grande diversidade estrutural, particularmente ao nível dos aminoácidos implicados na ligação ao antígeno.

Os primeiros 23 aminoácidos da região variável possuem um número limitado de variações conhecidas como subgrupos. Através da utilização de anticorpos monoclonais podem ser identificados subgrupos de CLL, 4 kappa ($V\kappa 1-V\kappa 4$) e 6 lambda ($V\lambda 1-V\lambda 6$). A estrutura do subgrupo influencia o potencial de polimerização das CLL, de tal modo que a AL está associada ao subgrupo $V\lambda 6$ e a doença de depósito das cadeias leves (DDCL) aos subgrupos $V\kappa 1$ e $V\kappa 4$.

2.2 Síntese

As CLL κ (cromossoma 2) possuem cerca de 40 genes funcionais $V\kappa$, 5 genes $J\kappa$ e um único gene $C\kappa$. As CLL λ (cromossoma 22) são formadas por aproximadamente 30 genes $V\lambda$, 4 pares de genes funcionais $J\lambda$ e um gene $C\lambda$.

As CLL são incorporadas nas moléculas de imunoglobulina durante o desenvolvimento dos linfócitos B, sendo expressas inicialmente na superfície das células pré-B. A sua produção ocorre ao longo do subsequente desenvolvimento das células B, atingindo a sua produção máxima ao nível dos plasmócitos. Os tumores associados aos diferentes estádios de maturação das células B secretam CLL monoclonais para a circulação passíveis de serem detectadas através de imunoensaios (figura 3).

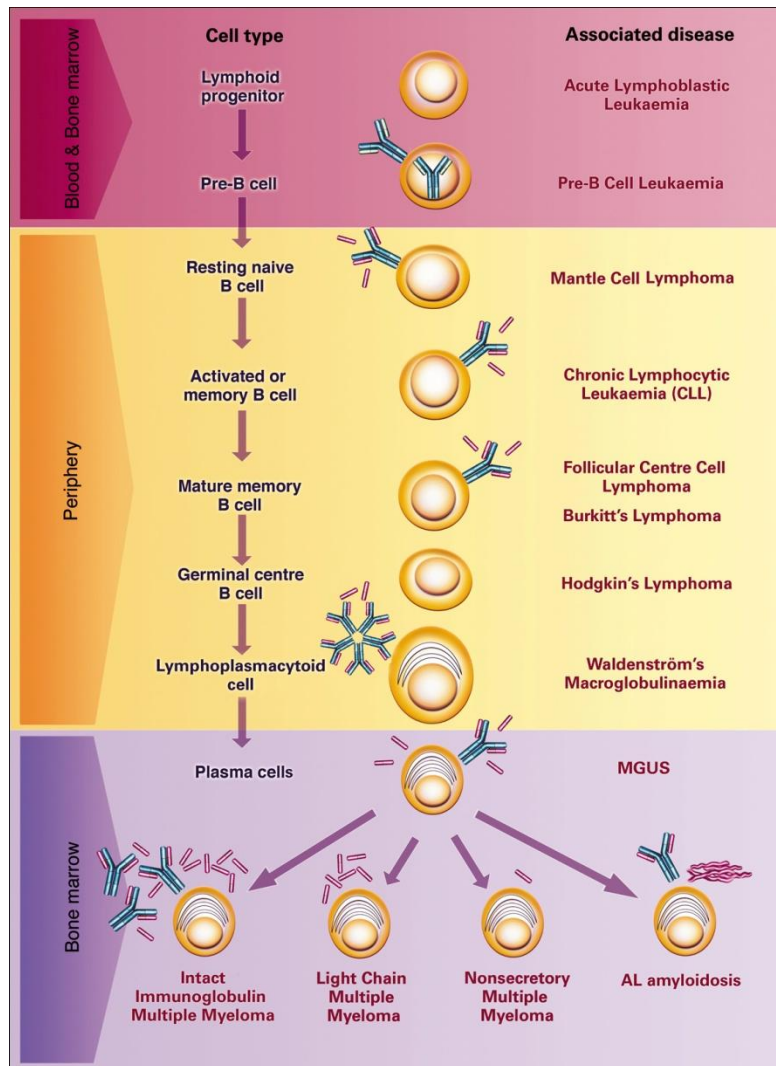


Figura 3. Desenvolvimento dos linfócitos B e patologias associadas (2).

A produção normal de CLL a partir das células B da medula óssea (MO) e dos gânglios linfáticos é de aproximadamente 500mg por dia. As moléculas entram na corrente sanguínea e são rapidamente distribuídas entre o compartimento intravascular e extravascular. Em condições normais a medula óssea contém cerca de 1% de plasmócitos, enquanto que nos doentes com MM este valor pode ser superior a 90%. Em certos casos de infecção crónica ou doença autoimune a MO pode conter 5-10% de plasmócitos, o que se associa a hipergamaglobulinémia com o correspondente aumento policlonal de CLL. A identificação de plasmócitos monoclonais na MO por histologia ou técnicas de citometria de fluxo é uma parte essencial do diagnóstico de MM e baseia-se frequentemente na detecção intracelular de cadeias κ e λ com características de monoclonalidade. É igualmente importante definir características de neoplasia nestes

TEMA DE REVISÃO

plasmócitos medulares do MM para o que são utilizados painéis de marcadores associados ao plasmócito normal (CD38+; CD138+; CD19+; CD56-; CD117-; CD45+). Qualquer alteração a este painel define uma população anómala.

Os plasmócitos produzem um dos cinco tipos de cadeias pesadas juntamente com cadeias leves κ ou λ . Para que a imunoglobulina completa adquira a conformação adequada a produção de CLL é cerca de 40% superior à síntese de cadeias pesadas. Tal como referido anteriormente, há duas vezes mais plasmócitos a produzir cadeias κ do que λ . As CLL κ são normalmente monoméricas, enquanto que as CLL λ tendem a associar-se formando dímeros, mas podem ocorrer formas de ambas as cadeias com graus superiores de polimerização (figura 4).

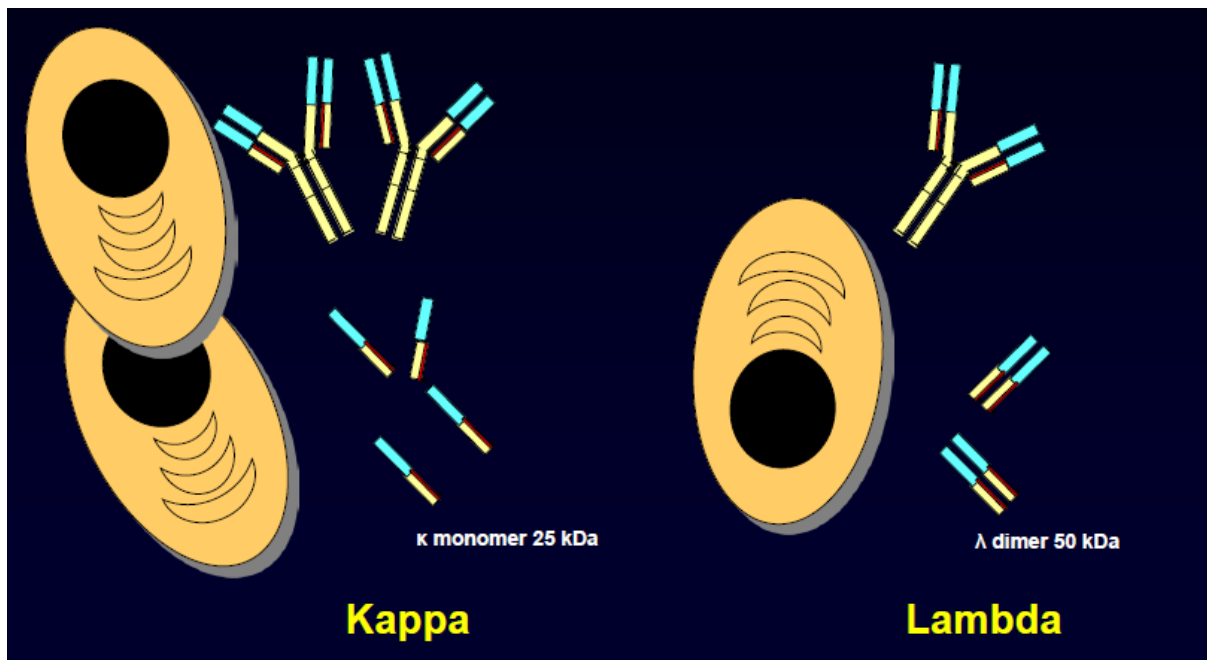


Figura 4. Representação esquemática de plasmócitos a produzirem imunoglobulinas completas com CLL κ monoméricas e CLL λ diméricas (van Hoeven KH. Serum free light chain assays in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma and other monoclonal gammopathies, The Binding Site [internet]. Disponível a partir de: <http://www.bindingsite.co.uk/media/vanHoeven080207.pdf>).

2.3 Eliminação e metabolização

Em condições normais as CLL têm uma semi-vida curta, sendo filtradas pelo glomérulo renal e metabolizadas nos túbulos proximais dos nefrónios. As CLL monoméricas, caracteristicamente κ , são eliminadas em 2-4 horas e as CLL diméricas, tipicamente λ , são eliminadas em 3-6 horas. Em doentes com MM em falência renal a remoção das CLL da circulação pode demorar 2-3 dias. Em contraste, as imunoglobulinas IgG têm uma semi-vida de cerca de 21 dias. A metabolização diária das CLL pelo rim pode ser de aproximadamente 10-30g, pelo que é fácil perceber que para que se encontrem CLL na urina estas têm que estar muito aumentadas no soro de forma a saturar os mecanismos de absorção.

Os túbulos renais distais secretam grandes quantidades de uromucoide (proteína de Tamm-Horsfall). Esta é a proteína dominante na urina normal e pensa-se que tem um papel importante na prevenção das infecções urinárias ascendentes. É uma glicoproteína relativamente pequena (80 kDa) que se agrega em polímeros de 20-30 moléculas. Um aspecto interessante é o facto desta proteína possuir uma pequena sequência peptídica capaz de se ligar especificamente às CLL, formando cilindros que são encontrados tipicamente na insuficiência renal aguda associada ao MMCL.

Em condições normais, 5-10mg de CLL são excretados por dia na urina. A sua origem exacta ainda não foi esclarecida mas provavelmente entram na urina através da superfície mucosa da parte distal dos nefrónios e uretra, juntamente com a IgA secretória (figura 5).

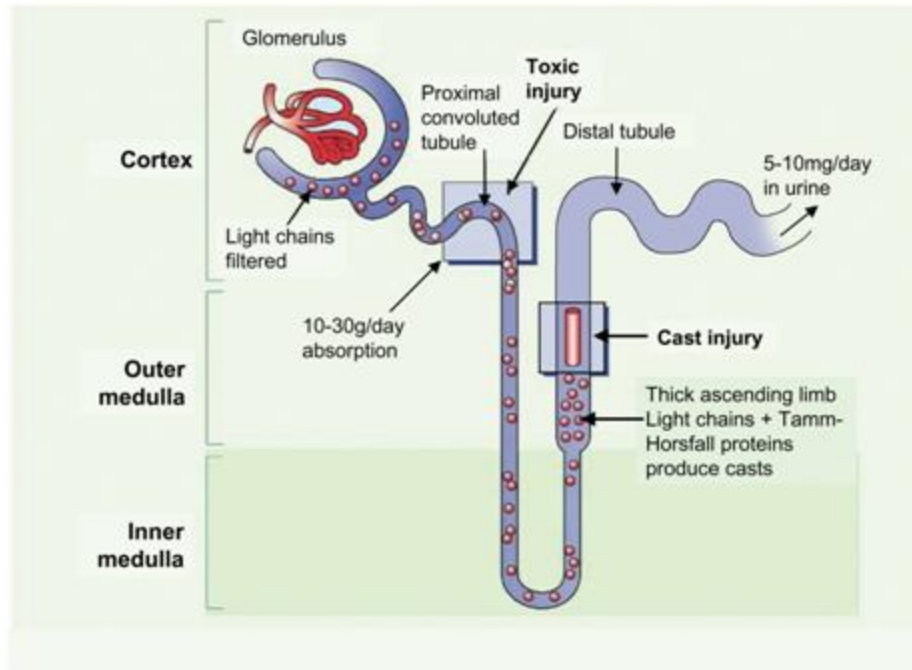


Figura 5. Representação esquemática de um nefrônio e os mecanismos de filtração, metabolização e excreção das CLL (2).

Tal como referido anteriormente, os monómeros κ têm uma eliminação três vezes mais rápida do que as moléculas diméricas λ devido ao seu tamanho menor. Apesar da produção de CLL κ ser duas vezes a das CLL λ , a sua remoção mais rápida da circulação faz com que a sua concentração sérica seja, na realidade, aproximadamente 50% mais baixa.

Devido à grande capacidade de metabolização pelos túbulos proximais, a quantidade de CLL na urina, mesmo quando a produção está consideravelmente aumentada, está mais dependente da função renal do que da síntese tumoral. Em consequência, num doente com MMCL a concentração de CLL na urina e no soro podem não evoluir de forma similar.

Considerando um hipotético doente com MMCL, à medida que o tumor cresce há um aumento constante das sCLL. Quando a síntese de CLL excede os 10-30g/dia (mais do que 30 vezes o normal) há uma saturação dos mecanismos de absorção renal e grandes quantidades de CLL passam para a urina. Nesta fase são identificados a maioria dos doentes com MMCL.

TEMA DE REVISÃO

As CLL não absorvidas pelos túbulos proximais entram nos túbulos distais podendo causar inflamação ou precipitar sob a forma de cristais, o que pode levar ao bloqueio do fluxo de urina causando a destruição do nefrónio. As concentrações de CLL continuamente crescentes são filtradas pelos nefrónios remanescentes levando a um ciclo vicioso de destruição renal acelerada com aumento de sCLL.

Este processo prolonga a semi-vida das sCLL de tal forma que as concentrações no soro sobem rapidamente em contraste com a excreção urinária que diminui à medida que o doente desenvolve falência renal terminal. Consequentemente, os níveis de CLL no soro e na urina divergem nos estadios tardios da doença. Enquanto que o aumento das concentrações no soro indica progressão da doença, concentrações urinárias mais baixas poderiam sugerir erradamente uma estabilização ou melhoria do doente.

A compreensão da nefrotoxicidade das cadeias leves livres e da forma como esta pode condicionar a sua concentração no soro e na urina, assim como o conhecimento dos mecanismos fisiológicos e patológicos referidos, permite concluir que na monitorização de doentes com patologias com CLL monoclonais a sua avaliação no soro é mais credível do que a mesma avaliação na urina.

3. IMUNOENSAIO PARA O DOSEAMENTO DAS CADEIAS LEVES LIVRES

Concentrações elevadas de CLL κ e λ podem ocorrer em diversas situações incluindo a estimulação imunitária, a insuficiência renal e as discrasias plasmocitárias. Indivíduos com hipergamaglobulinemia policlonal ou insuficiência renal têm frequentemente CLL κ e λ no soro elevadas devido ao aumento da sua síntese ou à diminuição da sua eliminação renal respectivamente, no entanto, a razão κ/λ (rCLL) permanece normal nestas situações (5). Uma rCLL significativamente alterada é em regra geral devido a uma patologia plasmoproliferativa (ou linfoproliferativa) que secreta CLL em excesso e perturba o balanço normal das cadeias leves livres κ e λ .

Os testes electroforéticos só podem ser usados para quantificar picos de cadeias leves monoclonais pois não são suficientemente sensíveis para identificar as CLL não tumorais. A determinação da rCLL reforça a utilidade dos imunoenaios para sCLL ao fornecer um importante indicador numérico de clonalidade.

O teste para o doseamento das cadeias leves livres no soro recomendado pelo *International Myeloma Working Group* (Freelite, The Binding Site, Birmingham, UK) é constituído por anticorpos policlonais. O ensaio consiste em duas determinações por nefelometria separadas, uma para quantificar as CLL κ e outra para quantificar as CLL λ .

3.1 Intervalos de referência

O estudo mais detalhado sobre a concentração das CLL em indivíduos normais foi publicado por Katzmann *et al.* (5) que definiram o intervalo normal utilizando soro fresco e congelado de 127 dadores saudáveis com idades compreendidas entre 21 e 62 anos e soro congelado de 155 dadores com idades compreendidas entre 51 e 90 anos. O intervalo de referência para o percentil 95 foi de 3.3-19.4mg/l para as CLL κ e de 5.7-26.3mg/l para as CLL λ . O intervalo de referência encontrado para a razão κ/λ foi de 0.3-1.2, mas foi decidido que o intervalo de diagnóstico devia incluir 100% dos dadores – intervalo de referência normal 0.26-1.65 (tabela 1). A utilização do

TEMA DE REVISÃO

intervalo de confiança de 100% aumentou a especificidade do teste de 95 para 100%, com uma descida na sensibilidade de 98 para 97%. Doentes com a razão κ/λ superior a 1.65 contêm excesso de CLL κ e presume-se que estão a produzir CLL κ monoclonais. Doentes com a razão κ/λ inferior a 0.26 contêm excesso de CLL λ e presume-se que estão a produzir CLL λ monoclonais.

O intervalo de confiança de 100% utilizado reduz a probabilidade da activação policlonal das células B originar uma razão anormal, mas é possível que isso aconteça, pelo que o teste deve ser interpretado no contexto clínico do doente. Se o doente tem uma infecção corrente ou um problema reumatológico o teste deve ser repetido posteriormente.

Tabela 1. Intervalos de referência e medianas para as concentrações de cadeias leves livres e razão κ/λ no soro de 282 indivíduos normais (5).

Cadeias leves livres	Mediana	Intervalo de referência
Kappa (percentil 95)	7.3mg/l	3.3-19.4mg/l
Lambda (percentil 95)	12.7mg/l	5.7-26.3mg/l
Razão κ/λ (percentil 100)	0.6	0.26-1.65
Razão κ/λ (percentil 95)	0.6	0.31-1.2

3.2 Limitações técnicas

Apesar do teste representar um grande avanço tem no entanto algumas limitações (6). Pode haver variações significativas entre lotes, diferentes antisoros policlonais podem conduzir a uma imunoreactividade variável das CLL monoclonais dando origem a resultados inconsistentes. Os antisoros policlonais são produzidos através da imunização com várias CLL monoclonais diferentes, estas não são representativas de todas as CLL monoclonais mas o alvo do anticorpo é a região constante da molécula que possui pouca variabilidade estrutural, contudo, as CLL tumorais podem ter substituições ou adições de aminoácidos ou podem apresentar uma polimerização anormal.

TEMA DE REVISÃO

Algumas cadeias leves monoclonais, particularmente a CLL κ não se diluem de forma linear. Terceiro, o excesso de antígeno pode originar resultados falsamente baixos por nefelometria, necessitando de uma diluição manual nas amostras com suspeita clínica. Quarto, alterações na sequência de aminoácidos da cadeia leve pode originar epitopos irreconhecíveis pelos anticorpos do reagente. Pelo contrário, uma polimerização extrema pode resultar num valor até 10 vezes superior ao real (tabela 2).

Tabela 2. Resumo das limitações técnicas do imunoensaio das CLL.

Limitação	Comentário
Variabilidade entre lotes de reagente	Coefficiente de variabilidade $\approx 10-20\%$
Excesso de antígeno	Quantidade muito subestimada
Perca de linearidade	Quantidade subestimada
Epitopos não reconhecidos	Pouco frequente
Polimerização extrema	Pouco frequente

3.3 Doseamento das cadeias leves livres na urina

A quantidade de cadeias leves urinárias é determinada tipicamente na electroforese das proteínas da urina de 24 horas. Também é possível determinar as cadeias leves na urina por nefelometria (1) mas à luz dos conhecimentos actuais esta técnica não deve ser recomendada por rotina (7). Bradwell *et al.* (1), determinaram a concentração das cadeias leves livres κ e λ na urina de 66 indivíduos normais sendo os valores encontrados respectivamente de 5.4 ± 4.95 e $3.17 \pm 3.3\text{mg/l}$ com uma razão κ/λ média de 1:0.54 (percentil 95).

Após analisarem amostras de urina de 20 doentes com o teste Freelite (The Binding Site) e por electroforese em gel de agarose-SDS (Hydragel proteinurie, Sebia), Le Bricon *et al.* concluíram que quando usavam a razão κ/λ o teste Freelite era mais sensível na detecção das CLL, mas a concentração era sobrestimada em 75% dos casos (7). Outro estudo com 224 amostras de doentes com mieloma a cadeias leves, demonstrou que não existia correlação entre as concentrações das CLL no soro e na urina determinadas por imunoensaio (3). Isto acontece porque o rim consegue metabolizar nos túbulos proximais uma grande quantidade de CLL impedindo que estas passem para a urina, pelo que o doseamento na urina não reflecte a produção tumoral.

4. DISCRASIAS PLASMOCITÁRIAS

4.1 Classificação

Em Maio de 2003 o *International Myeloma Working Group* publicou a classificação das gamopatias monoclonais, mieloma múltiplo e doenças relacionadas (8). O objectivo era o de uniformizar e simplificar os sistemas de classificação anteriores e facilitar a comparação entre os resultados de ensaios terapêuticos. Classificação:

1. GMSI
2. MM assintomático
3. MM sintomático
4. MM não secretor
5. Plasmocitoma solitário ósseo
6. Plasmocitoma extramedular
7. Plasmocitoma solitário múltiplo
8. Leucemia a plasmócitos

Em 2008 a Organização Mundial de Saúde publicou uma nova classificação dos tumores hematopoiéticos e do tecido linfóide (9). É uma classificação multiparamétrica que se baseia em critérios morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos. Esta classificação tem a vantagem de ser validada por estudos internacionais, revista periodicamente e altamente reprodutível. Classifica de forma precisa diferentes entidades e melhora a interpretação clínica. Nesta classificação as discrasias plasmocitárias são descritas no grupo das neoplasias das células B maduras. Classificação:

1. GMSI
2. Mieloma a plasmócitos (assintomático, não secretor e leucemia a plasmócitos)
3. Plasmocitoma solitário ósseo e plasmocitoma extramedular
4. Patologias com depósito de imunoglobulinas
 - Amiloidose primária
 - Doença de depósito das cadeias leves e pesadas
5. Mieloma osteoesclerótico (POEMS)

TEMA DE REVISÃO

Em 2009 o *International Myeloma Working Group* publicou uma proposta de classificação molecular do mieloma (10), na qual são fornecidas as recomendações para a utilização dos testes genéticos e a sugestão para que estes sejam introduzidos na prática clínica e na definição e formatação dos ensaios clínicos.

4.2 Mieloma múltiplo

O Mieloma Múltiplo é a segunda causa de doença hematológica maligna a seguir ao linfoma não-Hodgkin. Na população caucasiana a incidência anual é de aproximadamente 35 por 1 milhão de habitantes, aumenta com a idade e há um ligeiro predomínio da doença nos homens. A idade média ao diagnóstico é de 62 anos e 75% dos casos têm mais de 70 anos. O diagnóstico baseia-se na infiltração plasmocitária da medula óssea (figura 6), na presença de imunoglobulinas monoclonais no soro ou urina e no comprometimento de órgãos ou tecidos.

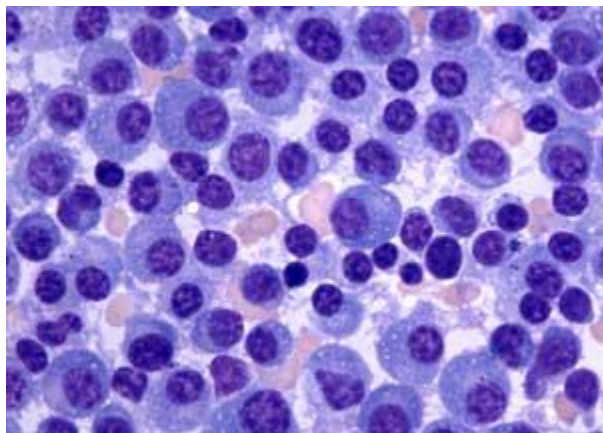


Figura 6. Infiltração plasmocitária da medula óssea no MM (11).

Hipercalecemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas são alterações comuns. O conteúdo normal de plasmócitos na MO é cerca de 1%, no MM esta percentagem é tipicamente superior a 30% podendo em alguns casos ser

superior a 90%. A incidência do MM com base no tipo de componente monoclonal encontra-se na figura 7.

TEMA DE REVISÃO

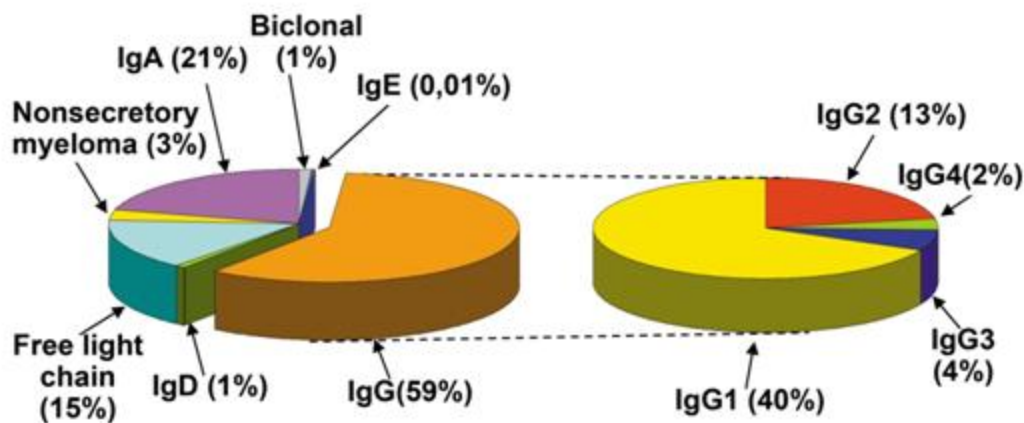


Figura 7. Classificação e incidência do MM com base no tipo de componente monoclonal (2).

A classificação do MM publicada em 2003 pelo *International Myeloma Working Group* e é a seguinte (8):

Mieloma múltiplo sintomático

- Proteína monoclonal no soro e/ou urina.
- Plasmócitos monoclonais na MO $\geq 10\%$.
- Comprometimento de órgãos ou tecidos.*

Mieloma múltiplo não secretor

- Proteína monoclonal ausente na IFX do soro e urina.
- Plasmócitos monoclonais na MO $\geq 10\%$.
- Comprometimento de órgãos ou tecidos.*

Mieloma múltiplo assintomático

- Proteína monoclonal no soro (IgG ou IgA) $\geq 30\text{g/l}$ e/ou plasmócitos monoclonais na MO $\geq 10\%$
- Ausência de sintomas e comprometimento de órgãos ou tecidos.*

TEMA DE REVISÃO

*Critérios para comprometimento de órgãos ou tecidos no MM:

Aumento do cálcio sérico – > 0.25mmol/l acima do limite superior do normal ou > 2.75µmol/l.

Insuficiência renal – creatinina > 173µmol/l.

Anemia – hemoglobina 2g/dl abaixo do limite inferior do normal ou < 10g/dl.

Lesões ósseas – lesões líticas ou osteoporose com fracturas por compressão.

Outros: hiperviscosidade sintomática, AL, infecções bacterianas recorrentes (> 2 episódios em 12 meses).

Em Maio de 2005 foi publicado o Índice Internacional de Estadiamento (12) para o MM o qual se baseia unicamente nas concentrações séricas de albumina e β2-microglobulina (tabela 3). Os sistemas de estadiamento anteriores incluíam a concentração das imunoglobulinas monoclonais, o que se verificou ser pouco relevante. No entanto, como veremos mais à frente, as sCLL mostraram ser úteis como marcadores de prognóstico do MM.

Tabela 3. Novo Índice Internacional de Estadiamento (12).

Estadio	Critério	Esperança média de vida (meses)
I	β2-microglobulina no soro < 3.5mg/l Albumina no soro ≥ 3.5g/dl	62
II	Critérios diferentes de I e III*	44
III	β2-microglobulina no soro ≥ 5.5mg/l	29

*O estadio II tem 2 categorias: β2-microglobulina no soro < 3.5mg/l mas albumina no soro < 3.5g/dl; ou β2-microglobulina 3.5 a < 5.5mg/l, independentemente da albumina no soro.

Embora as células envolvidas nos diferentes mielomas sejam morfológicamente semelhantes (plasmócito), já foram identificados subtipos da doença, com base em características genéticas e moleculares. Estes subtipos genéticos têm sido associados aos diferentes quadros clínicos e formas de evolução da doença. Neste contexto os mielomas podem ser divididos em dois subtipos: hiperdiploides e não-hiperdiploides. O subtipo não-hiperdiploide engloba os mielomas com translocações IgH, geralmente associados a uma clínica mais agressiva e menor sobrevivência. As três principais translocações IgH no mieloma são: t(11;14)(q13;q32),

TEMA DE REVISÃO

t(4;14)(p16;q32) e t(14;16)(q32;q23). Os mielomas hiperdiploides estão associados a formas mais indolentes da doença.

Outras alterações genéticas foram já identificadas e associadas ao prognóstico e quadro de evolução da doença, designadamente as deleções do cromossoma 13 e 17 e alterações do cromossoma 1 (deleção 1p e amplificação 1q).

Na classificação de 2009 do *International Myeloma Working Group* (10) são fornecidas as recomendações para a utilização dos testes genéticos e a sugestão para que estes sejam introduzidos na prática clínica e na definição e formatação dos ensaios clínicos.

4.3 Plasmocitoma solitário ósseo

Estes tumores do osso representam 3-5% das DP e são duas vezes mais frequentes nas mulheres do que nos homens. Aproximadamente 50% progridem para MM em 3-4 anos, enquanto que 30-50% podem sobreviver 10 anos.

Os critérios de diagnóstico são os seguintes (8):

- Proteína-M em baixa concentração ou ausente no soro e/ou urina.
- Destruição óssea localizada numa área devido ao clone de plasmócitos.
- MO não consistente com MM.
- Exame do esqueleto normal.
- Sem comprometimento de órgãos ou tecidos (excepto a lesão óssea única).

4.4 Patologias com depósito de cadeias leves monoclonais

4.4.1 Amiloidose a cadeias leves

A amiloidose a cadeias leves (amiloidose sistémica primária) caracteriza-se pela deposição tecidular extracelular de fibrilhas amilóides formadas por CLL monoclonais, ou fragmentos

TEMA DE REVISÃO

destas. Tipicamente estes doentes apresentam falência cardíaca ou renal, mas também podem apresentar envolvimento da pele, nervos periféricos ou outros órgãos.

A esperança média de vida situava-se nos 18 meses mas com o desenvolvimento das novas quimioterapias e técnicas de monitorização (particularmente as sCLL), a esperança média de vida é agora de 6-8 anos em doentes com uma boa resposta à terapêutica. Um clone de plasmócitos que cresce lentamente secreta as CLL monoclonais que são caracteristicamente do tipo λ . A AL tem uma incidência anual de 9 por 1 milhão de habitantes e a idade média ao diagnóstico é de 70 anos, sendo rara antes dos 40 anos. Os homens representam 60-65% dos doentes e cerca de 10% têm um MM associado.

4.4.2 Doença de depósito das cadeias leves

Na doença de depósito das cadeias leves, as CLL monoclonais precipitam nas membranas basais das células do rim e outros órgãos. Tal como na AL, a doença é progressiva e conduz à falência renal, cardíaca ou hepática, tendo um mau prognóstico. Esta rara patologia difere da AL por ser mais frequente em mulheres e em idades mais jovens (30-50 anos) e a insuficiência renal é um achado comum ao diagnóstico. Os depósitos contêm normalmente CLL κ (subgrupos V κ 1 e V κ 4).

4.5 Gamapatia monoclonal de significado indeterminado

A GMSI é uma entidade clínica que se caracteriza pela presença inesperada de uma proteína monoclonal em indivíduos sem evidência de MM, AL, macroglobulinémia de Waldenström, doenças linfoproliferativas, plasmocitoma ou outras doenças relacionadas.

A GMSI caracteriza-se por (8):

- Proteína-M no soro < 30g/l.
- Infiltração plasmocitária da MO < 10%.
- Ausência de outras doenças linfoproliferativas B.
- Sem comprometimento de órgãos ou tecidos.

TEMA DE REVISÃO

Esta gamapatia tem sido diagnosticada em 1% da população com mais de 50 anos, 3% com mais de 70 anos e até 10% com mais de 80 anos de idade, é duas vezes mais frequente nos Afro-Americanos e está associada a doenças inflamatórias e infecciosas. Devido à sua frequência, 50-60% de todas as gamopatias monoclonais caem nesta categoria e um grande número permanece não diagnosticado. Concentrações elevadas de CLL são raramente encontradas na urina. A GMSI progride para MM, AL ou outras DP a uma taxa anual de 1%.

5. IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES NO DIAGNÓSTICO

Para estabelecer a importância das sCLL no diagnóstico das DP é necessário responder a duas questões relevantes:

1. As sCLL podem complementar ou substituir o painel de testes existente no diagnóstico das DP?
2. Poderá um teste ser mais económico ou mais conveniente em termos práticos?

O *gold standard* para o diagnóstico das DP tem sido a electroforese (ELP) e a imunofixação (IFX) do soro e urina. No entanto, alguns estudos vieram sugerir que talvez fosse possível substituir os testes na urina pelo doseamento das CLL no soro tendo em conta a sua elevada sensibilidade. Num estudo com 224 doentes com MMCL verificou-se que a IFX e as CLL no soro permitiam identificar 100% dos doentes (3). De forma semelhante, num estudo realizado por Katzmann *et al.* (13) para avaliar a utilidade dos diferentes testes no diagnóstico da AL, em 110 doentes com AL não tratada e com as sCLL doseadas nos 120 dias após o diagnóstico, a combinação da IFX com as CLL no soro detectou anomalias em 99% dos doentes com AL (109 de 110) (tabela 4).

Tabela 4. Sensibilidade dos diferentes testes e sua combinação em 110 doentes com AL na altura do diagnóstico (13).

Teste	Sensibilidade
rCLL	91%
IFX soro	69%
IFX urina	83%
IFX soro e IFX urina	95%
rCLL e IFX urina	91%
rCLL e IFX soro	99%
Os 3 testes	99%

TEMA DE REVISÃO

No entanto, o estudo mais importante para responder às questões colocadas anteriormente foi feito por Katzmann *et al.* em 2006 (14). O objectivo pretendido era verificar se o doseamento das sCLL podia substituir a IFX da urina no diagnóstico de doentes com suspeita de terem uma discrasia plasmocitária. Os dados utilizados foram retirados da base de dados da Clínica Mayo (Rochester, Minnesota, EUA), tendo sido estudados 428 doentes com DP com uma IFX urinária positiva e com electroforese, IFX e doseamento de CLL no soro. Os doentes tinham diagnósticos de MM, AL, GMSI, MM assintomático, plasmocitoma solitário, DDCL e outras patologias mais raras. A electroforese com imunofixação do soro teria falhado o diagnóstico em 28 doentes (6.5%): AL (n=19), Plasmocitoma solitário ósseo (n=3), GMSI (n=3), MM (n=2) e MM assintomático (n=1). O doseamento de sCLL isoladamente teria falhado o diagnóstico em 61 doentes (14%), mas a combinação da IFX com sCLL identificou 99.5% dos doentes com IFX da urina positiva (tabela 5). Os dois doentes (0.5%) cujo diagnóstico correcto não teria sido feito caso a IFX urinária não tivesse sido realizada tinham uma GMSI de baixo risco.

Tabela 5. Sensibilidade dos diferentes testes de diagnóstico em 428 doentes com um componente monoclonal detectado na imunofixação da urina (14).

Teste	Sensibilidade
IFX soro	93.5 %
ELP soro	80.8 %
rCLL	85.7 %
IFX soro e rCLL	99.5 %

A conclusão a que se chega a partir destes e outros estudos é o facto das CLL no soro poderem substituir a IFX na urina de 24 horas no rastreio das DP, a única excepção é na suspeita de AL devido aos resultados obtidos em estudos subsequentes. Palladini *et al* (15) demonstraram uma sensibilidade de 96% para as CLL em combinação com a IFX no soro, 5 em 115 doentes não foram diagnosticados, e a IFX da urina nestes 5 doentes não diagnosticados foi positiva. Noutro estudo foram efectuados os cinco testes nos 30 dias após o diagnóstico em 581 doentes com AL. Em 11 doentes (1.9%) não foram detectadas anomalias no soro e na urina. Entre os outros 570 doentes, 6 (1%) não teriam sido detectados se a urina não tivesse sido testada (16). Tal como no

TEMA DE REVISÃO

estudo de Palladini os doentes que tiveram uma urina positiva e sCLL normais tinham todos CLL monoclonais λ , o que sugere uma potencial falha no antisoro CLL λ .

Apesar das importantes conclusões obtidas pelo estudo de Katzmann *et al.* (14) não há actualmente dados científicos que expliquem completamente o que o doseamento das CLL no soro acrescenta à IFX sérica. A sua maior limitação para responder a esta questão é o facto da população estudada incluir doentes com IFX urinária positiva. Este critério de selecção permitiu responder à pergunta colocada mas aumentou a probabilidade das CLL estarem aumentadas.

Há vários artigos que mostram que a combinação da ELP sérica ou da electroforese por capilaridade de zona com as CLL no soro aumenta a sensibilidade destes testes, o que não é de surpreender uma vez que estes métodos apenas detectam proteínas monoclonais num valor suficientemente elevado para serem visualizadas a partir de um *background* normal ou policlonal. A ELP e a electroforese por capilaridade de zona não devem ser consideradas suficientes para um diagnóstico de DP. Os níveis de sensibilidade usuais são de 1-2 g/l para a ELP sérica, 150-500 mg/l para a IFX e sensibilidade intermédia para a electroforese por capilaridade de zona (1). Os imunoensaios de CLL no soro têm uma sensibilidade inferior a 1 mg/l (5).

A estratégia de diagnóstico através da IFX sérica em combinação com as sCLL tem vantagens em termos fisiológicos mas também apresenta vantagens em termos de custos e de execução prática. Katzmann *et al.* (14) verificaram que o custo dos testes na urina de 24 horas, incluindo as proteínas totais, ELP e IFX, era aproximadamente o dobro do custo do doseamento das CLL no soro. A colheita de urina de 24 horas é um processo normalmente aceite com relutância pelo doente e com baixa adesão mas se não for realizada pode levar a que 10-17% dos casos com AL ou MMCL não sejam diagnosticados ao ser realizada apenas a IFX no soro. A facilidade do doseamento das CLL no soro pode solucionar este problema e conduzir a um diagnóstico efectivo e atempado destas patologias.

TEMA DE REVISÃO

Com base nestes e outros estudos as últimas recomendações do *International Myeloma Working Group* (4) são as de que as CLL no soro em combinação com a ELP e IFX no soro podem substituir a ELP e IFX na urina de 24 horas excepto na suspeita de AL. No rastreio da AL a IFX urinária deve ser sempre feita em adição aos testes no soro incluindo as CLL. No entanto, uma vez feito o diagnóstico de DP a IFX urinária deve ser realizada em todos os doentes.

6. IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES NO PROGNÓSTICO

O aumento da sensibilidade no diagnóstico e a possibilidade de eliminar a urina do painel de testes para o rastreio das DP era de alguma forma previsível assim que foi conhecida a sensibilidade analítica do método de doseamento das CLL no soro. O que também se demonstrou e que não era esperado foi que o valor das sCLL na altura do diagnóstico (valor *baseline*) pudesse ser usado para estabelecer um prognóstico de progressão da doença.

6.1 Gamapatia monoclonal de significado indeterminado

Rajkumar *et al* (17), num estudo alargado com 1148 indivíduos com GMSI, demonstraram que o risco de progressão da doença era significativamente maior (taxa 2.6) nos doentes com uma rCLL alterada comparativamente aos que tinham uma rCLL normal, e que este risco era independente do tipo e quantidade do componente monoclonal (figura 8A). A partir destes resultados foi construído um modelo de estratificação do risco de progressão da GMSI para MM com base no componente monoclonal, na classe de imunoglobulina e na rCLL. Com este propósito foi estabelecido que uma rCLL está alterada se é inferior a 0.26 ou superior a 1.65. Em adição à rCLL foi também associado ao risco de progressão para MM um componente monoclonal \geq a 1.5g/dl e uma cadeia pesada com um isotipo que não a IgG. O risco de progressão da doença aos 20 anos para doentes com 0, 1, 2 ou 3 factores de risco foi de 5, 21, 37 e 58% respectivamente (figura 8B).

A explicação para o risco aumentado de progressão da doença pode estar relacionada com a evolução do clone de plasmócitos. Os eventos genéticos e moleculares envolvidos na transformação da GMSI para MM levam a uma alteração da síntese das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas e à produção anormal das CLL monoclonais.

Figura 8A

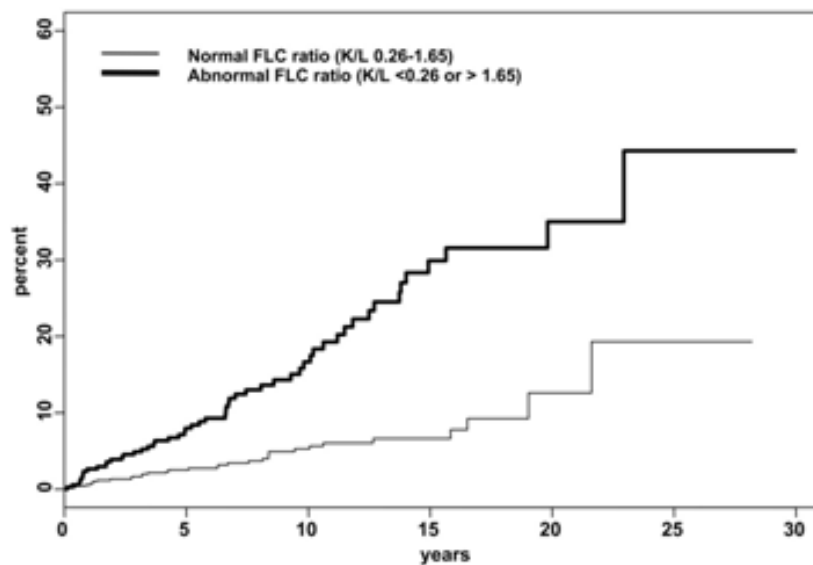


Figura 8B

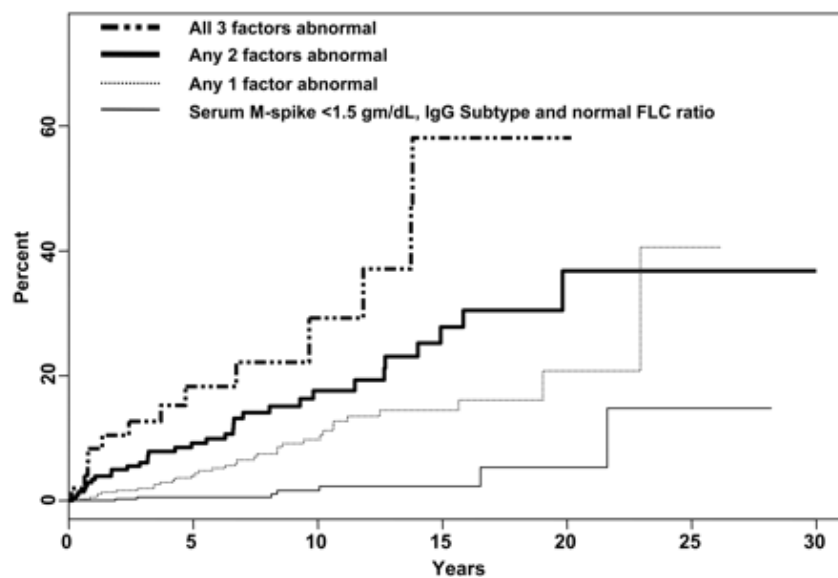


Figura 8A. Risco de progressão da GMSI com base na presença ou ausência de uma rCLL alterada (< 0.26 ou > 1.65) (17). **Figura 8B.** Risco de progressão da doença em 1148 indivíduos com GMSI utilizando um modelo de estratificação do risco incluindo o componente monoclonal, a classe de imunoglobulina e a rCLL. Factores de risco: rCLL < 0.26 ou > 1.65 , componente monoclonal ≥ 1.5 g/dl e isotipo não-IgG (17).

A prática corrente tem sido a de avaliar todas as GMSI anualmente de forma a antecipar e prevenir a progressão da doença. À luz dos conhecimentos actuais pode ser preferível fazer esta

TEMA DE REVISÃO

avaliação anual apenas nas GMSI de risco intermédio e alto. As GMSI de baixo risco (cerca de 40%) podem ser reavaliadas com mais tempo de intervalo ou só quando surgir outra patologia.

Com base nos factores de risco definidos por Rajkumar o *International Mieloma Working Group* publicou em 2010 (18) os critérios para os diferentes grupos de risco, o risco de progressão aos 20 anos e a monitorização recomendada para cada grupo (tabela 6).

Tabela 6. GMSI – Grupos de risco e monitorização recomendada (18).

Grupo de risco	Crítérios	Risco absoluto de progressão aos 20 anos (%)	Monitorização recomendada
Baixo	Proteína-M no soro < 1.5 g/dl Classe IgG rCLL normal: 0.26-1.65	2	Inicialmente aos 6 meses e se estável todos os 2-3 anos
Intermédio baixo	Presente 1 factor de risco	10	Inicialmente aos 6 meses e depois anualmente
Intermédio alto	Presentes 2 factores de risco	18	
Alto	Presentes os 3 factores de risco	27	

6.2 Mieloma múltiplo assintomático

Em adição à utilização das CLL no prognóstico da GMSI, os valores *baseline* no mieloma múltiplo assintomático (MMAS) também são úteis na avaliação do prognóstico. Num estudo da Clínica Mayo (Rochester, Minnesota, EUA) (19) foram analisados valores *baseline* de 273 doentes com MMAS entre 1970 e 1995. Uma rCLL anormal, com um valor ≤ 0.125 ou ≥ 8 , verificou-se estar associada com uma maior progressão da doença (taxa 2.3) (figura 9A). O grau de alteração da rCLL era independente dos factores de risco do MMAS incluindo o número de plasmócitos na medula óssea e a quantidade de proteína monoclonal no soro. Foi estabelecido um modelo de risco incorporando a rCLL, o número de plasmócitos na medula óssea $\geq 10\%$ e uma proteína monoclonal no soro $\geq 3\text{g/dl}$. Doentes com 1, 2 ou 3 factores de risco tiveram taxas de progressão aos 5 anos de 25, 51 e 76% respectivamente (figura 9B).

Os Autores notaram que ao contrário da GMSI, no qual a taxa de progressão da doença permanece constante ao longo o tempo, no MMAS o risco de progressão era maior nos primeiros

TEMA DE REVISÃO

anos. Ainda não foi esclarecida a associação da rCLL alterada com o prognóstico da doença mas especula-se que esteja relacionado com translocações das cadeias pesadas ou outras alterações genéticas.

Figura 9A

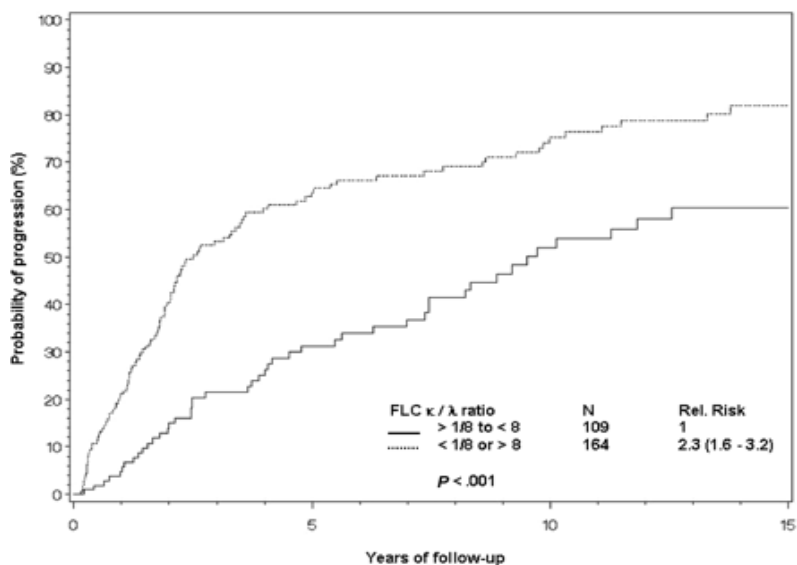


Figura 9B

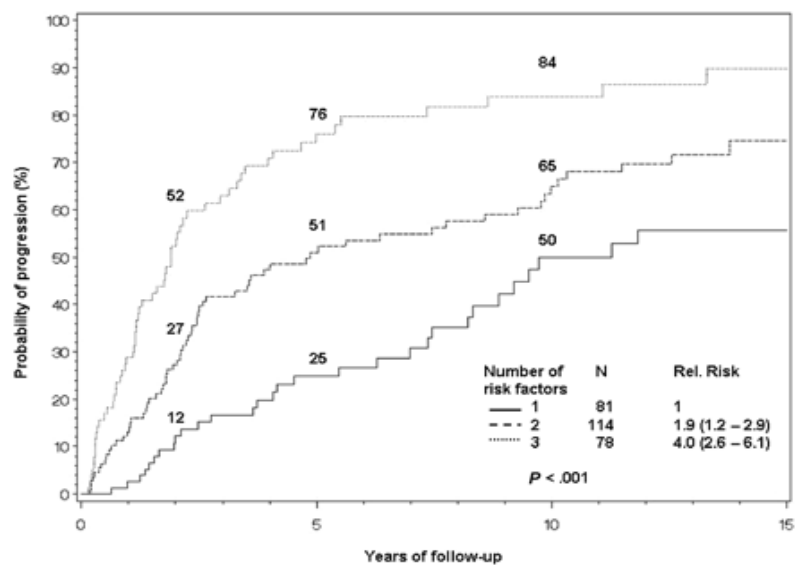


Figura 9A. Risco de progressão do MMAS para MM em 273 indivíduos com base em dois níveis diferentes de rCLL (19). **Figura 9B.** Risco de progressão do MMAS para MM com 1, 2 ou 3 factores de risco, incluindo rCLL < 0.125 ou > 8 , plasmócitos na MO $\geq 10\%$ e proteína-M $\geq 3\text{g/dl}$ (19).

6.3 Plasmocitoma solitário ósseo

Num estudo (20) com 116 doentes com plasmocitoma solitário ósseo foi determinada a rCLL retrospectivamente no soro colhido na altura do diagnóstico, 54 doentes (47%) tinham um valor anormal de rCLL (< 0.26 ou > 1.65) associado a um risco aumentado de progressão para mieloma. O risco de progressão aos 5 anos foi de 44% nos doentes com uma rCLL anormal na altura do diagnóstico, comparativamente a 26% nos doentes com uma razão normal.

Um a dois anos após o diagnóstico, uma proteína monoclonal persistente de 0.5g/dl ou superior era um factor de risco adicional de progressão para mieloma. Foi elaborado um modelo de estratificação do risco utilizando as duas variáveis da rCLL (normal ou alterada) e uma proteína monoclonal persistente inferior ou ≥ 0.5 g/dl. Os grupos com 0 factores de risco (baixo risco, n=31), 1 factor de risco (risco intermédio, n=26) e 2 factores de risco (risco elevado, n=18) tiveram taxas de progressão aos 5 anos de 13, 26 e 62% respectivamente.

6.4 Mieloma Múltiplo

Vários estudos demonstraram que os valores *baseline* de CLL são prognóstico de sobrevivência em doentes diagnosticados com mieloma sintomático. Kyrtonis *et al.* (21) verificaram que em 94 doentes com MM a rCLL tinha valor prognóstico. O valor *baseline* da mediana era de 3.57 em MM- κ (razão κ/λ) e de 45.1 em MM- λ (razão λ/κ). Uma rCLL superior à mediana correlaciona-se com creatinina e lactato desidrogenase elevadas, uma infiltração extensa da medula e MMCL, o qual apresenta uma maior propensão para lesão renal. A sobrevivência aos 5 anos foi de 82 e 30% em doentes com a rCLL inferior ou superior à mediana respectivamente (figura 10).

Van Rhee *et al.* (22) também demonstraram que entre 301 doentes submetidos a terapêutica, os que apresentavam níveis mais elevados de CLL (> 750 mg/l) tiveram os piores resultados. Os valores *baseline* de CLL mais elevados foram significativamente associados com MMCL, infiltração plasmocitária da MO $> 30\%$ e concentrações elevadas de creatinina ($\geq 176.8\mu\text{M}$ ou 2mg/dl), β_2 -microglobulina ($\geq 297.5\text{nM/l}$ ou 3.5mg/l) e lactato desidrogenase (≥ 190 U/l).

TEMA DE REVISÃO

Finalmente, Snozek *et al.* (23) num estudo com 790 doentes diagnosticados com MM sintomático entre 1995 e 1998 também demonstraram que valores *baseline* de rCLL < 0.03 ou > 32 (n=479) tiveram menos sucesso no tratamento comparativamente aos doentes com uma rCLL entre 0.03-32 (n=311), com uma esperança média de vida de 30 *versus* 39 meses respectivamente. Quando a rCLL alterada foi incluída num modelo utilizando os *cutoffs* aplicados no Índice Internacional de Estadiamento (12), isto é, albumina < 3.5g/dl e β 2-microglobulina \geq 3.5mg/l, verificou-se que a rCLL era um factor de risco independente. Doentes com 0, 1, 2 ou 3 factores de risco tiveram uma esperança média de vida de 51, 39, 30 e 22 meses respectivamente. Tendo em conta estes resultados tem sido sugerido a inclusão da rCLL no Índice Internacional de Estadiamento.

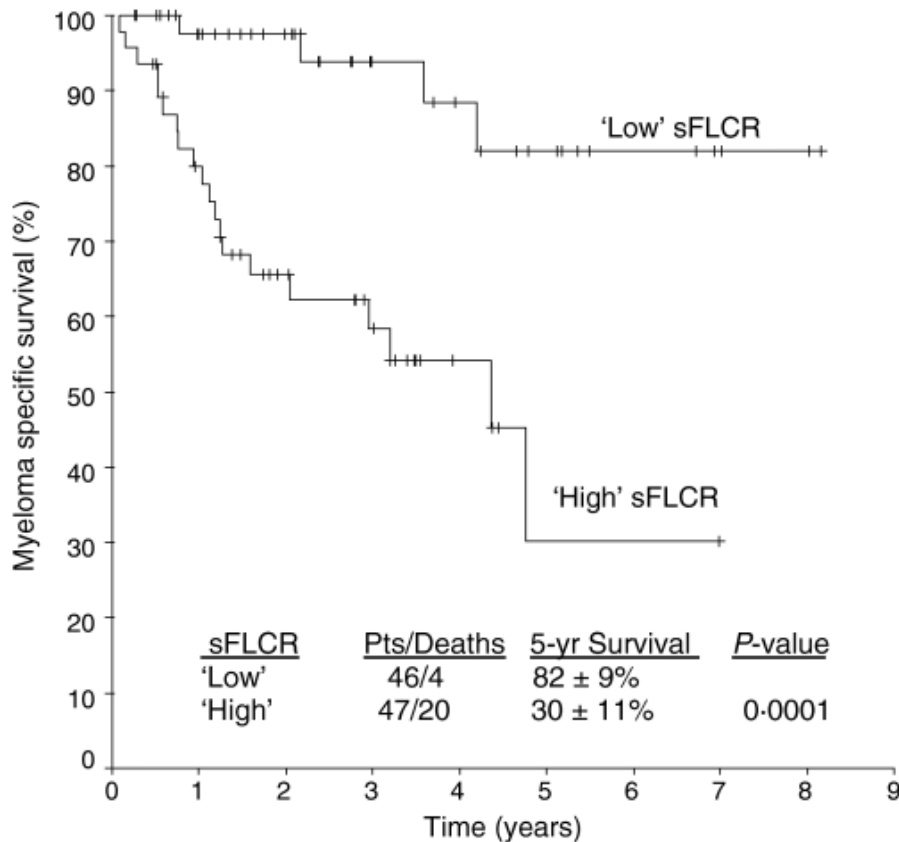


Figura 10. Percentagens de sobrevivência em doentes com MM de acordo com a quantificação de base de rCLL (21).

6.5 Amiloidose a cadeias leves

Num estudo (24) com 119 doentes com AL submetidos a um transplante de progenitores hematopoiéticos periféricos houve um risco de vida significativamente maior nos doentes com valores *baseline* de CLL mais elevados (taxa 2.6). Os valores de CLL ao diagnóstico correlacionaram-se com os níveis de troponinas cardíacas no soro e níveis mais elevados de CLL foram associados com um maior número de órgãos afectados pela proteína amilóide, sugerindo que valores mais elevados de CLL podem estar associados com uma doença mais avançada.

As últimas recomendações do *International Myeloma Working Group* (4) sobre a utilização das sCLL na avaliação do prognóstico são as de que a rCLL deve ser determinada na altura do diagnóstico em todos os doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado, mieloma múltiplo assintomático e sintomático, plasmocitoma solitário e amiloidose a cadeias leves.

7. IMPORTÂNCIA DAS CADEIAS LEVES LIVRES NA MONITORIZAÇÃO

Apesar da utilização das CLL na monitorização terapêutica poder ser considerada em três contextos – doenças oligosecretoras, MMCL e doença com uma imunoglobulina completa mensurável – o uso seriado por rotina deste ensaio só pode ser actualmente recomendado para a primeira situação. Apesar dos esforços para uniformizar a monitorização com CLL, como será abordado em seguida, até à data apenas alguns estudos validaram o interesse dos doseamentos seriados de CLL.

Para os doseamentos seriados devem ser usadas as CLL tumorais – CLL envolvidas (CLLe) ou a diferença entre as CLLe e as CLL não tumorais (CLLd) (25). A rCLL, com excepção da sua quantificação ao diagnóstico e na avaliação da remissão completa estrita, não é recomendada devido à observação não invulgar do efeito imunossupressor associado à quimioterapia das CLL não envolvidas (κ nos doentes com CLL monoclonais λ e λ nos doentes com CLL monoclonais κ), a rCLL observada quando um dos valores de CLL é muito baixo reflecte mais o grau de imunossupressão do que o valor do componente tumoral.

7.1 Critérios para avaliação de resposta publicados

7.1.1 Mieloma Múltiplo

O *International Myeloma Working Group* publicou os critérios para avaliação de resposta à terapêutica actualizados (26), os quais incluem o doseamento das CLL. Estes critérios, no que diz respeito às CLL, são apresentados na tabela 7. No entanto, não houve ainda estudos suficientes que validassem estes critérios.

TEMA DE REVISÃO

Tabela 7. Critérios de avaliação de resposta à terapêutica para as CLL (26).

	Mínimo para ser considerado mensurável	Resposta parcial (RP)	Remissão completa (RC)	Remissão completa estrita (RCe)	Progressão
MM sem componente monoclonal mensurável na urina e soro	CLLe \geq 100mg/l e rCLL alterado	Redução de 50% de CLLd	Não definido	rCLL normal e RC IFX e MO**	Aumento de 50% de CLLd
MM com componente monoclonal mensurável na urina e soro*	Determinação das CLL não recomendada	Determinação das CLL não recomendada	Determinação das CLL não recomendada	rCLL normal e RC IFX e MO**	Determinação das CLL não recomendada

*Componente monoclonal no soro \geq 10g/l e componente monoclonal na urina \geq 200mg/24 horas.

** Remissão completa: IFX negativa no soro e urina e infiltração plasmocitária da MO <5%.

7.1.2 Amiloidose a cadeias leves

No 10º Simpósio Internacional da Amiloidose foi definida a monitorização com CLL em doentes com AL. Para CLLe \geq 100mg/l há uma resposta parcial se a redução das CLLe for de 50% e pelo contrário uma progressão da doença se há um aumento de 50% das CLLe (27). Estes critérios foram parcialmente validados com base no trabalho de Lachmann, Sanchorawala e Palladini como veremos em seguida.

7.2 Avaliação da monitorização terapêutica

7.2.1 Doenças oligosecretoras (AL, MM oligosecretor e DDCL)

Lachmann *et al.* (28) demonstraram que os doentes com AL que atingiram mais de 50% de redução das CLLe tinham uma sobrevida maior. A maioria dos doentes neste estudo estava a receber quimioterapia não-mieloblátiva. Posteriormente, num grupo de doentes submetidos a transplante de células hematopoiéticas, Dispenzieri *et al.* (24) verificaram que uma redução de 50% das CLLe não era prognóstico de sobrevivência mas que estava associada com uma taxa mais elevada de resposta hematológica e de órgão e a normalização do CLLe era o determinante

TEMA DE REVISÃO

mais importante para prever uma resposta hematológica, de órgão e a taxa de sobrevivência. Num estudo com 45 doentes submetidos a transplante de células hematopoiéticas, Cohen *et al.* (29) demonstraram que a normalização da rCLL aos 3 meses era indicativo de ausência de progressão e da taxa de sobrevivência. A discrepância entre os estudos com doentes submetidos e não submetidos a transplante pode estar na proporção que atinge uma redução de CLL $>50\%$.

Sanchowala *et al.* (30) também demonstraram que quanto mais acentuada fosse a redução das CLL nos doentes com AL, maior a probabilidade da resposta hematológica e de órgão ser completa. Além disso Palladini *et al.* (31) mostraram que a diminuição das CLL tem correlação com a diminuição do NT-proBNP (fragmento N-terminal do pro-péptido natriurético tipo B), um marcador da função cardíaca e que se reflecte na taxa de sobrevivência.

Por definição os doentes com MM oligosecretor não possuem proteínas monoclonais detectáveis no soro e na urina através dos testes convencionais de electroforese e têm que ser monitorizados por biópsia osteomedular. Apesar de ainda não haver dados suficientes que validem a utilização das CLL na monitorização de doentes com MM oligosecretor, o ensaio das sCLL parece ser um teste simples e exacto que permite reduzir o número de biópsias medulares. As sCLL avaliam a síntese em toda a medula óssea (e locais extramedulares) e por isso reflectem melhor a actividade tumoral do que os aspirados medulares isolados que podem falhar alguns depósitos tumorais.

Do mesmo modo e apesar de não haver ainda estudos publicados que validem a utilização das sCLL na monitorização de doentes com DDCL, a experiência pessoal dos Autores indica que este parâmetro é também um importante marcador nesta patologia.

7.2.2 Mieloma múltiplo a cadeias leves

Vários estudos demonstraram já a excelente sensibilidade das sCLL no diagnóstico de MMCL. No entanto, quando se avalia as alterações nas sCLL e na quantidade de proteína-M na ELP da urina ao longo do tempo, verifica-se que há uma relação mas, até à data, nenhum estudo mostrou coeficientes de correlação elevados. Dispenzieri *et al.* (25) avaliaram a relação entre as sCLL e as proteínas urinárias totais e o componente monoclonal na urina de 24 horas em 101 doentes

TEMA DE REVISÃO

com valores *baseline* de CLLe ≥ 5 mg por 100 ml. O coeficiente de correlação entre as percentagens de variação das CLLe e da proteína monoclonal na urina, após 2 meses de quimioterapia, foi baixo.

7.2.3 Mieloma múltiplo com imunoglobulina completa mensurável

A monitorização das sCLL pode eventualmente mostrar ser adequada em doentes com mieloma com Ig completa, tendo em conta que aproximadamente 95% destes doentes também produzem sCLL em excesso (32). No entanto, com excepção da quantificação dos valores *baseline*, há actualmente poucos estudos que suportem esta recomendação. As possibilidades para a utilização das sCLL podem ser analisadas em três categorias:

1. Utilização das CLL como um indicador precoce do sucesso terapêutico.
2. Utilização das CLL para estabelecer uma remissão completa estrita.
3. Utilização das CLL em substituição das determinações urinárias.

Tem sido notado que as sCLL podem ser mais sensíveis como indicadores de uma resposta ou recaída precoces do que as determinações usuais da cadeia pesada envolvida. No que diz respeito à detecção de uma resposta precoce ou falta dela, a explicação é lógica. A semi-vida das CLL é de 2-6 horas, enquanto que a semi-vida de uma IgG típica é de 8-21 dias. No entanto, não foi ainda demonstrado que uma detecção precoce da ausência de resposta indique uma falência terapêutica final, ou que o atraso de 3-4 semanas que pode ocorrer com a determinação das cadeias pesadas afecte realmente o resultado terapêutico do doente.

Determinações seriadas das sCLL podem também detectar uma recaída mais precoce do que a ELP. Uma vez mais, a dificuldade reside na ausência de dados que suportem o facto de que o conhecimento da reactivação da doença ou da falência terapêutica alguns meses mais cedo tenha algum impacto no sucesso terapêutico final do doente. Apesar do argumento de que uma detecção precoce da falência terapêutica pode ter vantagens em termos económicos, tendo em conta que os agentes terapêuticos são muito dispendiosos, não há actualmente dados suficientes para recomendar o abandono de um regime terapêutico com base nas CLL isoladamente em doentes com patologia não oligosecretora.

TEMA DE REVISÃO

Apesar da normalização da rCLL ter sido incluída nos critérios que definem uma remissão completa estrita no *International Myeloma Working Group Uniform Response Criteria* (26), não existem actualmente dados que documentem que uma remissão completa com ou sem rCLL é indicador da ausência de progressão da doença ou taxa de sobrevivência. Há um estudo publicado onde os doentes foram tratados com doxorubicina e dexametasona durante 2 ou 3 meses seguido de talidomida e dexametasona durante 2 meses (33). Os Autores descobriram que a normalização da rCLL após um ou dois ciclos de tratamento, o que ocorreu em 8 dos 37 doentes, estava significativamente associado com uma RC ou RCe.

Nos doentes com mieloma com Ig completa sem proteinúria de Bence Jones significativa, a ELP na urina não é feita frequentemente. Contudo, os doentes com uma doença avançada podem desenvolver proteinúria de Bence Jones com ou sem doença extramedular. Por razões ainda não esclarecidas, ocorre a expansão de um subclone maligno de plasmócitos, o qual é incapaz de produzir quantidades significativas de cadeias pesadas, mas que retém a capacidade de produzir cadeias leves. Se não se fizerem avaliações periódicas da urina ou sCLL este fenómeno pode não ser detectado (34). No entanto, actualmente ainda não há estudos que suportem a utilização das sCLL em substituição da electroforese das proteínas da urina de 24 horas na monitorização destes doentes.

As últimas recomendações do *International Myeloma Working Group* (4) sobre a utilização das sCLL na monitorização terapêutica são de que devem ser efectuados por rotina doseamentos seriados de CLL nos doentes com AL, MM oligosecretor e DDCL. A rCLL também deve ser feita em todos os doentes com MM que atingiram uma remissão completa para determinar se atingiram uma remissão completa estrita.

CONCLUSÕES

Em resumo, há actualmente três indicações importantes para a introdução do doseamento das cadeias leves livres no estudo das discrasias plasmocitárias e que são recomendadas pelo *International Myeloma Working Group*.

1 - No contexto do diagnóstico, o doseamento das CLL no soro com a determinação da razão κ/λ em associação com a electroforese das proteínas e a imunofixação no soro aumenta a sensibilidade do diagnóstico e permite prescindir do estudo da urina de 24 horas. A única excepção é na suspeita de AL em que a IFX na urina deve ser feita em adição aos testes no soro. No entanto, uma vez feito o diagnóstico de uma DP, o estudo da urina de 24 horas é requerido para todos os doentes.

2 - No contexto do prognóstico - a determinação da rCLL na altura do diagnóstico tem valor prognóstico sobre a progressão da doença e a taxa de sobrevivência nos doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado, mieloma múltiplo assintomático e sintomático, plasmocitoma solitário e amiloidose a cadeias leves.

3 - No contexto da monitorização - o doseamento seriado das CLL deve ser feito por rotina na monitorização terapêutica dos doentes com AL, mieloma múltiplo oligosecretor e DDCL. Também deve ser efectuada a determinação da rCLL na avaliação de uma remissão completa do MM, a sua normalização é actualmente um requisito necessário para estabelecer uma remissão completa estrita de acordo com o *International Myeloma Working Group Uniform Response Criteria*.

Tendo o doseamento das CLL no soro demonstrado ser uma valiosa ferramenta no estudo das DP o ensaio apresenta contudo ainda algumas limitações técnicas, o que pode trazer alguns problemas no que se refere à sua utilização em doseamentos seriados, essas limitações incluem a variabilidade entre lotes e por vezes a diluição de forma não linear.

TEMA DE REVISÃO

Futuras investigações incluem estabelecer a importância em termos clínicos da monitorização da resposta à terapêutica com as CLL no soro em doentes com MM com imunoglobulina completa. Com exceção do diagnóstico inicial e da sua determinação para estabelecer uma remissão completa estrita, a sua utilização não está preconizada nestes doentes. A avaliação do componente monoclonal e a sua monitorização nestes doentes pode ainda beneficiar da introdução dos novos testes “*HeavyLite*” recentemente descritos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, Drew R. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem*. 2001;47:673-680.
2. Bradwell AR. Serum free light chain analysis (plus hevyLite). 6th ed. Birmingham: The Binding Site Ltd; 2010.
3. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet*. 2003;361:489-491.
4. Dispenzieri A, Kyle RA, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Einsele H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccardo M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BGM. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009;23:215-224.
5. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem*. 2002;48:1437-1444.
6. Tate JR, Mollee P, Dimeski G, Carter AC, Gill D. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin Chim Acta*. 2007;376:30-36.
7. Le Bricon T, Bengoufa D, Belakehal M, Bousquet B, Erlich D. Urinary free light chain analysis by the Freelite immunoassay: a preliminary study in multiple myeloma. *Clin Biochem*. 2002;35:565-567.
8. Kyle RA, Child JA, Durie BGM, Bladé J, Boccardo M, Ludwig H et al. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haem*. 2003;121:749-757.

TEMA DE REVISÃO

9. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. World Health Organization; 2008.
10. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BGM, Carrasco R, Sezer Orhan, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23:2210-2221.
11. Keren DF. Multiple Myeloma, laboratory testing for plasma cell proliferative processes. *Clin Lab news*. 2010;36:8-10.
12. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M., Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncology*. 2005; 23:3412-3420.
13. Katzmann JA, Abraham RS, Dispenzieri A, Lust JA, Kyle RA. Diagnostic performance of quantitative κ and λ free light chain assays in clinical practice. *Clin Chem*. 2005;51:878-881.
14. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA, Snyder MR, Plevak MF, Larson DR, Abraham RS, Lust JA, Melton III LJ, Rajkumar SV. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:1575-1578.
15. Palladini G, Russo P, Bosoni T, Verga L, Sarais G, Lavatelli F, Nuvolone M, Obici L, Casarini S, Donadei S, Albertini R, Righetti G, Marini M, Graziani MS, D'Eril GVM, Moratti R, Merlini G. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. *Clin Chem*. 2009;55:499-504.
16. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, Larson DR, Snyder MR, Lust JA, Rajkumar SV, Dispenzieri A. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem*. 2009;55:1517-1522.
17. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton III LJ, Bradwell AR, Clark RJ, Larson DR, Plevak MF, Dispenzieri A, Katzmann JA. Serum free light chain ratio is an

TEMA DE REVISÃO

- independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2005;106:812-817.
18. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadoro M. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010;24:1121-1127.
 19. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, Clark RJ, Melton III LJ, Gertz MA, Kumar SK, Fonseca R, Jelinek DF, Rajkumar SV. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 2008;111:785-789.
 20. Dingli D, Kyle RA, Rajkumar SV, Nowakowski GS, Larson DR, Bida JP, Gertz MA, Therneau TM, Melton III LJ, Dispenzieri A, Katzmann JA. Immunoglobulin free light chains and solitary plasmacytoma of bone. *Blood*. 2006;108:1979-1983.
 21. Kyrtsolis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N, Sachanas S, Tzenou T, Papadogiannis A, Galanis Z, Kalpadakis C, Dimou M, Kyriakou E, Angelopoulou MK, Dimopoulou MN, Siakantaris MP, Dimitriadou EM, Kokoris SI, Panayiotidis P, Pangalis GA. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007; 137: 240-243.
 22. Van Rhee F, Bolejak V, Hollmig K, Pineda-Roman M, Anaissie E, Epstein J, Shaughnessy Jr JD, Zangari M, Tricot G, Mohiuddin A, Alsayed Y, Woods G, Crowley J, Barlogie B. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood*. 2007;110:827-832.
 23. Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, Melton III LJ, Kumar S, Greipp PR, Clark RJ, Rajkumar SV. Prognostic value of the serum-free light chain in patients with multiple myeloma and proposed incorporation into the International Staging System. *Leukemia*. 2008;22:1933-1937.

TEMA DE REVISÃO

24. Dispenzieri A, Lacy MQ, Katzmann JA, Rajkumar SV, Abraham RS, Hayman SR, Kumar SK, Clark R, Kyle RA, Litzow MR, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IM, Porrata LF, Elliott MA, Johnston PB, Greipp PR, Witzig TE, Zeldenrust SR, Russell SJ, Gastineau D, Gertz MA. Absolute values of immunoglobulin free light chain are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2006;107:3378-3383.
25. Dispenzieri A, Zhang L, Katzmann JA, Snyder M, Blood E, DeGoey R, Henderson K, Kyle R, Oken M, Bradwell A, Greipp P. Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood*. 2008;111:4908-4915.
26. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, Ludwig H, Gahrton G, Beksac M, Crowley J, Belch A, Boccadaro M, Turesson I, Joshua D, Vesole D, Kyle R, Alexanian R, Tricot G, Attal M, Merlini G, Powles R, Richardson P, Shimizu K, Tosi P, Morgan G, Rajkumar SV. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006; 20:1467-1473.
27. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, Ferman J, Hazenberg BP, Hawkins P, Merlini G, Moreau P, Ronco P, Santhorawala V, Sezer O, Solomon A, Grateau G. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis. *Am J Hematol*. 2005;79:319-328.
28. Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB, Hawkins PN. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes with concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br J Haematol*. 2003;122:78-84.
29. Cohen AD, Zhou P, Chou J, Teruya-Feldstein J, Reich L, Hassoun H, Levine B, Filippa DA, Riedel E, Kewalramani T, Stubblefield MD, Fleisher M, Nimer S, Comenzo RL. Risk-adapted autologous stem cell transplantation with adjuvant dexamethasone +/- thalidomide for systemic light chain amyloidosis: results of a fase II trial. *Br J Haematol*. 2007;139:224-233.

TEMA DE REVISÃO

30. Sanchorawala V, Seldin DC, Magnani B, Skinner M, Wright DG. Serum free light-chain responses after high-dose intravenous melphalan and autologous stem cell transplantation for AL (primary amyloidosis). *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:597-600.
31. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, Perlini S, Perfetti V, Bosoni T, Obici L, Bradwell AR, D'Eril GM, Fogari R, Moratti R, Merlini G. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood.* 2006;107:3854-3858.
32. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA, Bradwell AR. Serum-free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2004;126:348-354.
33. Hassoun H, Reich L, Klimek VM, Dhodapkar M, Cohen A, Kewalramani T, Zimman R, Drake L, Riedel ER, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Filippa DA, Fleisher M, Nimer SD, Comenzo RL. Doxorubicin and dexamethasone followed by thalidomide and dexamethasone is an effective well tolerated initial therapy for multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2006;132:155-161.
34. Dawson MA, Patil S, Spencer A. Extramedullary relapse of multiple myeloma associated with a shift in secretion from intact immunoglobulin to light chains. *Haematologica.* 2007; 92:143-144.