

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**INFECÇÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV): PATOGÉNESE E
DIAGNÓSTICO / RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

Ana Rita Nunes Monteiro

Dissertação / Relatório de estágio orientada/o pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira e, coorientada pela Professora Doutora Maria Cristina Crespo Silva Marques, com a supervisão de estágio da Doutora Maria de Fátima Consciência.

Mestrado em Análises Clínicas

2017

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Ana Rita Nunes Monteiro

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Maria Cristina Crespo Silva Marques e com a supervisão de estágio da Doutora Maria de Fátima Consciência.

Mestrado em Análises Clínicas

2017

ÍNDICE

Agradecimentos	12
Resumo	13
Abstract	14
Caracterização do laboratório de estágio	16
Fase Pré-Analítica	17
1. Atendimento do utente	18
2. Colheita de amostras biológicas	19
3. Triagem e conservação de amostras	25
4. Critério de rejeição de amostras	27
Fase Analítica	28
A. Hematologia	29
1. Equipamentos	30
1.1. Advia 2120i com módulo de veterinária	30
1.2. Hi-Auto A1c (HA 8160)	39
1.3. Vesmatic 30 Plus	41
1.4. Sysmex CA 500	42
2. Técnicas manuais	45
B. Microbiologia	48
1. Equipamentos	49
1.1. Vitek 2 Compact	49
2. Técnicas manuais	51
C. Imunologia e Endocrinologia	61
1. Equipamentos	62
1.1. Cobas e411	62
1.2. Unicap (Phadia 100)	66
1.3. Vidas®	68
2. Técnicas manuais	70
D. Bioquímica – Química Clínica	73
1. Equipamentos	74

a. Clinitek Atlas	74
b. Cobas Integra Plus 400	76
c. Hydrasys	78
2. Técnicas manuais	83
Controlo de Qualidade Interno	87
Avaliação Externa da Qualidade	90
Fase Pós-Analítica	92
1. Emissão dos boletins de resultados	92
2. Validação biopatológica	92
3. Entrega dos boletins de resultados	93
Bibliografia	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de tubos de vácuo para colheita de sangue por punção venosa	20
Figura 2 – Representação do equipamento Advia 2120i	30
Figura 3 – Representação do equipamento Hi-Auto (HA 8160)	39
Figura 4 – Representação do equipamento Vesmatic 30 Plus	41
Figura 5 – Representação do equipamento Sysmex CA 500	42
Figura 6 – Representação da cascata da coagulação	43
Figura 7 – Representação da execução de esfregaço de sangue periférico	47
Figura 8 – Representação do equipamento Vitek 2 Compact	49
Figura 9 – Representação das cartas de identificação e antibiograma	49
Figura 10 – Representação do equipamento Cobas e411	62
Figura 11 – Representação do equipamento Unicap (Phadia 100)	66
Figura 12 – Representação do equipamento Vidas	68
Figura 13 – Representação do equipamento Clinitek Atlas	74
Figura 14 – Representação do equipamento Cobas Integra Plus 400	76
Figura 15 – Representação do perfil electroforético de proteínas	78
Figura 16 – Representação do gel de imunoelectroforese	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Instrução Técnica para obtenção de exsudados	22
Tabela 2 – Situações patológicas associadas à alteração de tamanho dos Glóbulos Vermelhos	31
Tabela 3 – Situações patológicas associadas à alteração de cor dos Glóbulos Vermelhos	32
Tabela 4 – Situações patológicas associadas à alteração de forma dos Glóbulos Vermelhos	33
Tabela 5 – Situações patológicas associadas às inclusões eritrocitárias	34
Tabela 6 – Situações patológicas associadas à alteração de distribuição dos Glóbulos Vermelhos	35
Tabela 7 – Situações patológicas associadas às alterações quantitativas dos Glóbulos Brancos	36
Tabela 8 – Situações patológicas associadas às alterações quantitativas de plaquetas	37
Tabela 9 – Valores de referência do hemograma no adulto	38
Tabela 10 – Resultados possíveis de B.K. directo	57
Tabela 11 – Resultados possíveis de B.K. cultural	57
Tabela 12 – Parâmetros analíticos obtidos pelo equipamento Cobas e411	62
Tabela 13 – Análise dos resultados possíveis de infecção pelo Vírus da Hepatite B	63
Tabela 14 – Análise dos resultados possíveis de infecção pelo Citomegalovírus	64
Tabela 15 – Parâmetros analíticos obtidos pelo equipamento Unicap	66
Tabela 16 – Parâmetros analíticos obtidos pelo equipamento VIDAS	68
Tabela 17 – Parâmetros analíticos obtidos pelo equipamento Clinitek Atlas	74
Tabela 18 – Parâmetros analisados pelo equipamento Cobas Integra Plus 400	76

LISTA DE ABREVIATURAS

β-HCG – Beta-Human Chorionic Gonadotropin

γ-GT – Gamaglutamiltranspeptidase

ACTH – Adrenocorticotropic Hormone

ALT – Alanina aminotransferase

APTT – Activated Partial Thromboplastin Time

AST – Aspartate aminotransferase

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BASO – Basófilos

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular média

CK – Creatine Kinase

CK-MB – Creatine Kinase-MB

CLED – Cystine lactose electrolyte deficient agar

CPK – Creatine phosphokinase

CQI – Controlo de Qualidade Interno

CTFF – Capacidade total de fixação de ferro

FSH – Follicle-stimulating Hormone

GB – Glóbulos Brancos

GN – Gram negativo

GP – Gram positivo

GSGC – Gelose sabouraud gentamicina cloranfenicol

GV – Glóbulos Vermelhos

HBc – Proteína core do vírus da hepatite B

HBs – Proteína de superfície do vírus da hepatite B

HCV – *Hepatitis C Virus*

HDL – High Density Lipoprotein

HGM – Hemoglobina Globular média

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IC – Instruções de colheita

INR – International normalised ratio

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IST – Infecção Sexualmente Transmissível

IT – Instrução técnica

KOH – Potassium Hydroxide

LCR – Líquido cefaloraquidiano

LDH – Lactate dehydrogenase

LDL – Low Density Lipoprotein

LH – Luteinizing Hormone

NH – *Neisseria haemophilus*

PCR – Protein C reactive

PCR-hr – Protein C reactive high sensitive

PEROX – Peróxidos

PLT – Plaquetas

POCT – Point-of-care testing

PSA – Prostate Specific Antigen

PSM – Process systems manager

PTOG – Prova de tolerância oral à glucose

RA – Rheumatoid Arthritis

RAST'S – Radioallergosorbent test

RBC – Eritrócitos

RETIC – Reticulócitos

RF – Rheumatoid Factor

RIQAS – Randox International Quality Assessment

TASO – Anti-estreptolisina O

TG – Tiroglobulina

TIBC – Total iron-binding capacity

TP – Tempo de protrombina

TPO – Tireoperoxidase

TSA – Teste de susceptibilidade aos antibióticos

VDRL – Veneral disease research laboratory

VGM – Volume Globular médio

VS – Velocidade de sedimentação

WBC – Leucócitos

YST – Leveduras

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecer à minha família pois sem eles nada disto seria possível, pais, avós e irmã. Em segundo lugar ao meu namorado e amigos por todo o apoio fora da faculdade.

Às minhas colegas de turma, por toda a entre-ajuda nesta caminhada pelo mestrado.

À Dra. Fátima Consciência pela oportunidade de estágio no Biolabor, assim como a todas as colegas de laboratório por todo o ensino e ajuda.

Ao professor José Miguel, pelo apoio no desenvolvimento do tema de monografia.

À professora Cristina e a todos os outros professores que colaboraram durante todo o mestrado, pois sem dúvida que sem eles não era possível atingir este nível de aprendizagem.

NOTA: O PRESENTE RELATÓRIO E MONOGRAFIA FOI ESCRITO AO ABRIGO DO ANTIGO ACORDO ORTOGRÁFICO

RESUMO

O presente relatório tem como finalidade descrever as actividades realizadas no Laboratório de Análises Clínicas, Biolabor, local de realização do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas, nomeadamente nas áreas de Hematologia, Microbiologia, Imunologia, Bioquímica e Virologia.

Serão descritos todos os métodos e equipamentos utilizados nas várias valências assim como a análise dos parâmetros e o controlo de qualidade do Laboratório.

O estágio decorreu num período de 6 meses. Inicialmente foi realizado um enquadramento teórico do funcionamento do laboratório, assim como de todos os procedimentos analíticos a realizar.

Na fase pré-analítica foi realizado o seguimento do utente desde a sua entrada no laboratório, confirmação das análises prescritas e finalmente a colheita do produto biológico a analisar. Ainda nesta fase foram adquiridos conhecimentos no processo de triagem, conservação de amostras e rejeição de amostras.

Na fase analítica são descritos os processos automáticos a realizar pelos diversos equipamentos assim como o enquadramento teórico. Na área da hematologia os equipamentos utilizados são: Advia 2120i, Hi-Auto A1c (HA 8160), Vesmatic 30 Plus e Sysmex CA 500. Na área da microbiologia, além das sementeiras de culturas de produtos biológicos foram realizados os testes de identificação de estirpes e o estudo de sensibilidade aos antibióticos com o apoio do aparelho automatizado Vitek 2 Compact. Nos estudos imunológicos as diversas análises são efectuadas nos equipamentos automáticos Cobas e411, Unicap (Phadia 100) e Vidas. Na área da bioquímica são utilizados os equipamentos Clinitek Atlas, o equipamento Cobas Integra Plus 400 e o equipamento Hydrasys. Além das técnicas realizadas nos equipamentos automáticos são também descritas as técnicas manuais efectuadas.

Todas as fases apresentam um controlo de qualidade interno estrito de modo a garantir a qualidade dos nossos resultados evitando situações de erros aleatórios e/ou sistemáticos. O controlo de qualidade interno é avaliado através de gráficos Levey-Jennings e pela métrica 6σ . Além do controlo de qualidade interno é realizada a avaliação externa da qualidade pela participação nos programas INSA e RIQAS.

Como fase pós-analítica foi realizado o seguimento desde a emissão de boletins de resultados, validação biopatológica, finalizando com a entrega do boletim de resultados.

Palavras-chave: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica, Imunologia, Virologia, Controlo de Qualidade.

ABSTRACT

The present work describes the activities that occurred in Biolabor, a clinical laboratory, during the Master in Laboratory Medicine's internship. The main internship areas were Hematology, Microbiology, Immunology, Biochemistry and Virology.

In this report, the methods and related equipment are described, as well as the analytical and the quality control procedures in clinical laboratory.

The internship lasted for six months, starting with the theoretical framework about laboratory activities and analytical procedures.

In the pre-analytical phase, it is described the patient follow-up since the admission in the laboratory, passing by prescribed tests' confirmation and finally the harvest of the biological product to be analyzed. At this phase some knowledge was obtained about screening processes, preservation and rejection of samples.

In the analytical phase the automatic procedures performed by different equipment are described as well their theoretical framework. In hematology the equipment used was: Advia 2120i, Hi-Auto A1c (HA 8160), Vesmatic 30 Plus and Sysmex CA 500. In microbiology, it was performed the culture of biological samples, followed by the identification of strains and respective antibiotic sensitivity study, using the Vitek 2 Compact automated device. In immunological studies the different kinds of analyzes were performed on the following automatic equipment: Cobas e411, Unicap (Phadia 100) and Vidas. Last but not the least, in biochemistry the equipment used was: Clinitek Atlas, Cobas Integra Plus 400 and Hydrasys. In addition to the techniques performed on the automatic equipment, the manual techniques are also described.

All phases have presented a narrow internal quality control in order to guarantee the quality of results, avoiding situations of random and / or systematic errors. The internal quality control was evaluated through Levey-Jennings' studies and the 6σ metrical. Beyond the internal quality control, it was also performed an external quality evaluation process using the INSA and RIQAS programs.

Finally, in the post-analytical phase, it was done the follow-up since results emission and biopathological validation until the delivery of the results bulletins.

Keywords: Hematology, Microbiology, Biochemistry, Immunology, Virology and Quality Control.

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Biolabor, Laboratório de Análises Clínicas, Lda, situa-se na Rua Luís de Camões nº10, em Santarém. Está certificado pela IQNet - ISO 9001:2008; APCER - NP EN ISO 9001:2008; APCER - Normas para o Laboratório Clínico Edição nº 2 - Maio 2003. Mantém protocolos de colaboração técnica com várias entidades da área da saúde, como, Clínica Médica e de Diagnóstico Dr. Joaquim Chaves; Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge; CGC Centro de Genética Clínica; GPDN - Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal Dr. Sérgio Castedo, S.A. e Crioestaminal.

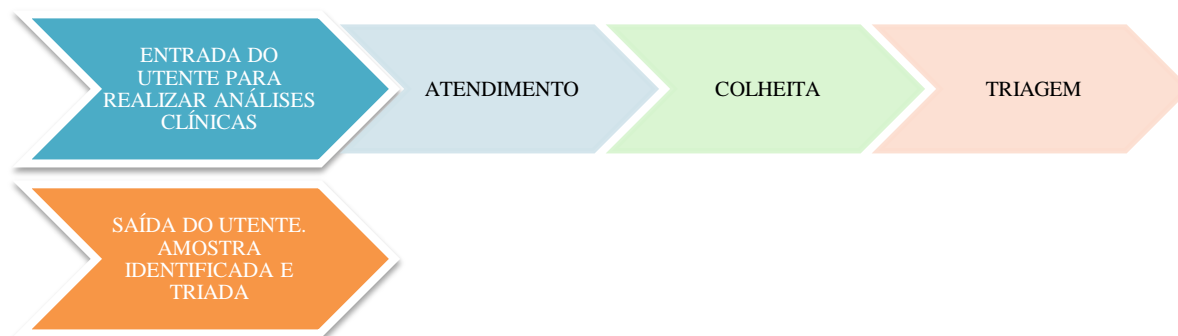
Apresenta controlo de qualidade interno, com a monitorização de todas as fases, Pré-analítica; Analítica e Pós-analítica. A avaliação externa da qualidade é avaliada por organismos exteriores ao laboratório, nomeadamente o INSA (Instituto Dr. Ricardo Jorge) e o RIQAS (Randox International Quality Assessment).

O laboratório apresenta a zona de receção onde se encontra a sala de espera; duas salas de colheitas; a área analítica de Hematologia; a área analítica de Microbiologia; a área analítica de Imunologia e Bioquímica; a sala de Triagem e a sala de lavagem de material.

O laboratório encontra-se sob a responsabilidade da Directora Técnica, Dra. Maria de Fátima Consciência, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos. Tem como colaboradores: uma responsável de Qualidade, Dra. Noélia Piteira, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos; uma Técnica Superior de Análises; três Técnicas de Diagnóstico e Terapêutica; duas Técnicas de Análises Clínicas e três Recepcionistas. Além do laboratório central, ainda possui 4 postos de colheitas.

FASE PRÉ-ANALÍTICA

Esta fase engloba todos os processos desde o atendimento dos utentes até à obtenção da amostra biológica a analisar. As etapas do processo pré-analítico são: o atendimento do utente, a colheita de amostras biológicas e a triagem dessas amostras.



É na fase pré-analítica que são confirmados os dados da ficha do utente assim como são confirmadas as análises prescritas. É importante antes de proceder à recolha da amostra confirmar que o utente cumpre todos os requisitos necessários.

É nesta fase que ocorre a maioria dos erros analíticos. Os principais erros que surgem nesta fase relacionam-se com a má preparação do utente como o jejum incorrecto, com a identificação incorrecta dos produtos biológicos devido a erro técnico do sistema informático ou por distração do técnico de análises, com a má conservação de amostras como no caso de não refrigerar urinas tipo II, com a recolha reduzida de volume de sangue que altera as proporções de sangue para anticoagulante na distribuição pelos tubos, com a contaminação de amostras como quando a urina é colhida em recipientes impróprios e as amostras consideradas não conformes devido a hemólise, lipémia ou por conter coágulos.

De modo a minimizar estes erros da fase pré-analítica são estabelecidos procedimentos chave. É do dever tanto das recepcionistas como da técnica de análises verificar se o utente se encontra em condições de realizar a colheita assim como se as análises geradas pelo sistema informático coincidem com o pedido do médico prescritor. Sempre que um produto biológico não apresente condições para execução analítica deve ser rejeitado de modo a minimizar os erros que possam surgir dessa análise.

1. Atendimento do utente

O atendimento do utente é realizado pelas recepcionistas do laboratório, por ordem de chegada, excepto em situações em que o utente é prioritário, como o caso da diabetes, gravidez, pessoas com deficiência, crianças com idade inferior a 3 anos ou utentes que realizem a Prova de Tolerância Oral à Glucose (PTOG).

Cabe às recepcionistas a realização de um pequeno inquérito, relativamente à preparação correcta do utente para a colheita da amostra biológica. É realizada a marcação de análises e é fornecida a informação necessária à preparação de determinadas análises, como o tempo de jejum e a colecta correcta de amostras.

Quando necessário, é entregue ao utente a Instrução de colheita (IC) específica relativamente à colheita de um produto biológico específico, como no caso da colheita de urina de 24H.

É na zona de atendimento do utente que se realiza a abertura da ficha de utente. Cada utente apresenta um código exclusivo que é gerado a partir do sistema informático. Assim, o utente tem associado neste código todas as análises prescritas pelo seu médico.

2. Colheita de amostras biológicas

A colheita de amostras biológicas é realizada pela técnica de análises ou pela técnica de terapêutica e diagnóstico, na sala de colheitas. Antes da entrada do utente na sala de colheitas, esta deve estar previamente preparada com todo o material necessário à colheita.

É da responsabilidade do técnico que realiza a colheita de amostras biológicas a confirmação das análises prescritas pelo médico. O técnico deve confirmar novamente com o utente se este cumpre os requisitos necessários à análise.

Acoplado à ficha do utente, seguem as etiquetas com o código de barras que é gerado para o utente. Estas etiquetas são distribuídas correctamente pelos recipientes que irão conter as amostras biológicas garantindo a rastreabilidade de todo o processo analítico, minimizando os erros da fase pré-analítica.

2.1. Colheita de sangue venoso

Para a colheita do sangue venoso o utente deve estar sentado ou deitado com o braço estendido e sem roupa apertada.

O material para a colher deve estar preparado. Inicia-se o processo de colheita ao enroscar a agulha na seringa sem retirar a cápsula de protecção e posteriormente são identificados os tubos necessários.

Para proceder à punção venosa, é colocado o garrote aproximadamente a 10 cm da zona de punção, faz-se a palpação da veia a puncionar e desinfecta-se a zona com álcool a 70° ou betadine. Deve-se pedir ao utente para fechar a mão.

As veias a examinar durante a palpação devem seguir a ordem: fossa antecubital (veias medianas, basílica e cefálica), antebraço e dorso de ambas as mãos.

Durante a punção deve-se desapertar o garrote. Se as veias são finas o garrote deve permanecer até acabar de puncionar o local. No final do processo pedir ao utente para abrir a mão e verificar se este se encontra bem disposto. Pressionar a zona de punção até verificar que há paragem de sangue e colocar um penso.

Deve ser descartada a agulha para o contentor próprio para perfurantes. A zona de descarte da agulha deve ser sempre limpa após a sua utilização com álcool.

Após puncionar, distribuir o sangue venoso pelos diferentes tubos, requeridos para a análise do utente.

Neste laboratório não é utilizado o sistema de vácuo (Figura 1), mas é mantida a distribuição dos tubos pela seguinte ordem: Hemocultura, Tubo de soro; Tubo com citrato (coagulação e VS); Tubo com heparinato e Tubo com EDTA (hemograma).



Figura 1 - Representação de tubos de vácuo para colheita de sangue por punção venosa. Adaptado de http://pt.made-in-china.com/co_chinaglass/product_Blood-Collect-Tube-Pack_hhosiyiy.html

2.2. Colheita de urina

O utente é informado do processo de colheita de urina através da Instrução de Colheita (IC) específica.

Para a análise de urina tipo II deve ser colhida a 1ª urina da manhã e entregar o mais rápido possível para a análise no laboratório. Caso não seja possível guardar no frigorífico por um curto período de tempo.

Para a colheita de urina de 24H, deve ser registada a hora do início de colheita. A 1ª urina é rejeitada e as seguintes são aproveitadas para um recipiente próprio de modo a evitar contaminações até perfazer as 24H ou seja, até à hora em que se deu início a colheita. Durante a colheita, a urina deve ser refrigerada e após concluir a colheita também deve ser entregue de imediato no laboratório.

Na colheita de urina para urocultura o utente deve passar com uma toalhita de limpeza seguida da passagem de gaze com soro fisiológico no meato urinário. O primeiro jacto de urina não deve ser aproveitado e é aconselhável que para esta colheita seja utilizada a 1ª urina da manhã.

2.3. Colheita de fezes

O utente é informado do processo de colheita através da IC específica. Para a análise de sangue oculto e também na pesquisa de ovos, quistos e parasitas devem ser recolhidas as fezes de 3 dias diferentes. As amostras devem ser recolhidas para recipiente próprio de modo a evitar contaminações, devem ser refrigeradas e conservadas ao abrigo da luz.

Para a coprocultura, na pesquisa de *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* a amostra de fezes deve ser colocada em recipiente esterilizado e entregue até 1H após a colheita ou em frasco com meio ETM de modo a que a quantidade não ultrapasse o limite indicado e neste caso as amostras são estáveis até 3 dias.

2.4. Colheita de exsudados

Para a colheita de exsudados é utilizada uma zaragatoa estéril adequada ao produto a recolher. Se a colheita não é feita no laboratório, mas sim num posto de colheitas, a amostra deve seguir de imediato para o laboratório em meio de transporte adequado.

Os vários tipos de exsudados apresentam diferentes instruções técnicas (IT) de colheita, como os descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Instrução Técnica para a obtenção de exsudados

Tipos de Exsudados	Instrução Técnica
Exsudado amigdalino	O utente inclina a cabeça para trás, abre bem a boca e baixa a língua. Passar a zaragatoa na zona das amígdalas, incluindo as zonas vermelhas e pontos brancos (se existentes). Pode ser utilizado um baixa língua para facilitar a colheita.
Exsudado auricular	Passar a zaragatoa no ouvido direito ou esquerdo ou em ambos. Utiliza-se uma zaragatoa diferente para cada um.
Exsudado faríngeo; orofaríngeo ou rinofaríngeo	O utente inclina a cabeça para trás, abre bem a boca e baixa a língua. Passar a zaragatoa na zona rinofaríngea. Pode ser utilizado um baixa língua para facilitar a colheita.
Exsudado nasal	O utente inclina a cabeça para trás. Passar a zaragatoa na narina esquerda e direita até que encontre resistência (até virem as lágrimas aos olhos). Para a pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> , não é necessária a introdução muito profunda da zaragatoa.
Exsudado nasofaríngeo	O utente inclina a cabeça para trás. Passar uma zaragatoa flexível na narina esquerda e direita com cuidado e o mais fundo possível.
Exsudado ocular	Passar a zaragatoa no olho direito ou esquerdo ou ambos (a colheita é feita na zona interna da pálpebra inferior). Utiliza-se uma zaragatoa diferente para cada um.

Tabela 1 – Instrução Técnica para a obtenção de exsudados (continuação)

Tipos de Exsudados	Instrução Técnica
Exsudado vaginal	<p>O utente deita-se em posição ginecológica. Passar a zaragatoa de alginato de cálcio ou de dacron na zona de maior exsudado ou no fundo do saco vaginal posterior e colo do útero. Para auxiliar a colheita utiliza-se um espéculo (excepto em crianças e mulheres virgens). O procedimento é repetido com uma segunda zaragatoa. Uma das zaragatoas serve para realizar o esfregaço (no acto da colheita) e a outra serve para efectuar a análise em sementeira.</p>
Exsudado uretral	<p>Na mulher, a colheita é feita com uma zaragatoa a nível da uretra, antes de se realizar qualquer lavagem local.</p> <p>No homem, a colheita é feita através de pressão do pénis para que apareça uma gota de secreção que é colhida com a zaragatoa. Se não existir essa gota é introduzida uma zaragatoa fina na uretra com rotação suave. Esta colheita é feita de manhã antes da 1ª micção ou no mínimo 3 horas após a última micção e antes de se lavar.</p>
Pús – Supurações superficiais	<p>É utilizada uma zaragatoa ou agulha e seringa. É efectuada a limpeza do local com solução salina estéril e retirado o pús, secreções ou tecidos devitalizados. A colheita de pús deve ser realizada na zona mais profunda da ferida.</p>
Pús – Supurações fechadas	<p>É utilizada uma agulha e seringa. Após a colheita é feito o transporte da seringa sem a agulha.</p>

2.5. Prova de Tolerância Oral à Glucose

O jejum deve ser de 8 horas e nunca superior a 14 horas. Nos 3 dias que antecedem a colheita o utente deve manter a sua actividade física regular e não fazer restrições na sua dieta.

Nas provas de Tolerância Oral à Glucose (PTOG), a solução de glucose deve ser ingerida no espaço máximo de 5 minutos e o utente não deve comer, nem fumar e manter-se em repouso (é permitido ingerir 1 copo de água). A PTOG é contra-indicada para utentes que apresentem glicémia de jejum > 140 mg/dl.

GRÁVIDAS: é feita a colheita de sangue em jejum, após a ingestão de 75g de glucose dissolvida em cerca 300 ml de água e é realizada nova colheita aos 60 e 120 minutos.

FORA DO CONTEXTO DE GRAVIDEZ: é feita a colheita de sangue em jejum, após a ingestão de 75g de glucose dissolvida em cerca de 300ml de água e é realizada nova colheita aos 120 minutos.

CRIANÇAS: é feita a colheita de sangue em jejum., após a ingestão de 1.75g de glucose por cada kg de peso da criança (mínimo 10 g e máximo 75 g) dissolvidos em 200ml de água e é realizada nova colheita aos 60 minutos e 120 minutos.

APÓS REFEIÇÃO: é feita a colheita de sangue em jejum. Após a ingestão de pequeno-almoço enriquecido em hidratos de carbono é feita nova colheita de sangue após 120 minutos. Se o utente já apresentar diagnóstico de diabetes é recomendado que faça o seu pequeno-almoço/almoço habitual e a sua medicação.

3. Triagem e conservação de amostras

Neste laboratório existe sistema informático de triagem, Process Systems Manager (PSM) fornecido pela Roche Sistemas de Diagnóstico. Através do PSM as amostras seguem uma linha de análise.

O PSM é uma interface entre plataformas informáticas e tem como objectivo canalizar os processos laboratoriais. Estes processos englobam a colheita de amostras biológicas, monitorização do controlo de qualidade e sua validação, distribuição das amostras pelos sectores e equipamentos onde são realizadas as análises, arquivo de amostras biológicas e finalmente descarte das amostras.

O PSM é adaptado e programado para as necessidades do nosso laboratório. É na recepção que se obtêm as etiquetas segundo o processo do utente. Estas etiquetas apresentam um código de barras que é único para cada utente.

Após a colheita do produto biológico, o PSM auxilia no processo de triagem. Os tubos secos ou com gel para a obtenção de soro são centrifugados e encaminhados para a secção de Química analítica/ Imunologia. Os tubos de coagulação para a obtenção de plasma são centrifugados e encaminhados para a secção de Hematologia. Os restantes tubos são distribuídos pelas secções conforme o pedido de análise. No caso de envio de tubos para laboratório exterior há separação de alíquotas e o acondicionamento devido.

Sempre que a amostra acaba a análise num dos equipamentos esta passa no PSM para sabermos qual o processo a seguir. Caso a amostra já tenha sido analisada na totalidade é dada a informação de arquivo.

Muitas amostras são ainda distribuídas em alíquotas para posterior análise. Estas alíquotas também seguem um padrão de arquivo que pode ser de refrigeração ou congelação.

É o PSM que nos indica quais as amostras que podem ser descartadas após estarem arquivadas.

Os tempos de arquivo assim como o seguimento do processo de análise são configurados por cada laboratório.

Para a obtenção de soros e plasmas as amostras também seguem uma linha de processo.

Para a obtenção de soro os tubos devem permanecer no mínimo 30 minutos à temperatura ambiente para que ocorra a coagulação completa. Após coagulação centrifugar 10 minutos a 2500 rpm. Após a centrifugação deve verificar-se se amostra está bem separada, caso contrário voltar a centrifugar. Se a amostra apresentar fibrina, mexer o soro com um palito de uso único e voltar a centrifugar. A centrifugação deve ocorrer até 60 minutos após a colheita de modo a evitar a diminuição da glucose. De modo geral é aceitável o período de 2 horas para que se realiza a centrifugação, uma vez que após este período há alterações significativas além da glucose de potássio, fósforo, creatinina e as transaminases (AST e ALT).

Para a obtenção de plasma os tubos podem ser directamente centrifugados durante 15 minutos entre 2000-3000 rpm. Os tubos de plasma para a análise da coagulação não devem ser centrifugados nos postos de colheita.

Nos postos de colheita as amostras biológicas seguem regras de conservação e transporte.

As amostras para exame microbiológico como as uroculturas devem ser conservadas entre 2 a 8°C e no transporte devem ser acondicionadas em malas térmicas refrigeradas. Os tubos de hemograma, soro e plasma devem ser mantidos em suporte e no transporte devem ser acondicionados numa mala térmica sem refrigeração. As amostras que necessitem de refrigeração ou congelamento imediato devem ser transportadas em mala térmica acondicionados em cooler refrigerado ou congelado e estes em caixas de esferovite próprias. Se estas amostras apresentarem doseamento de potássio ou ionograma deve ser realizada a separação do gel para não haver difusão dos iões potássio dos glóbulos para o soro. Deve ser realizada a separação em alíquota. Finalmente amostras que necessitem de transporte à temperatura ambiente, como os exsudados para exame microbiológico ou as fezes em ETM para coprocultura, devem seguir em mala térmica sem refrigeração.

4. Critério de rejeição de amostras

A rejeição de amostras pode ocorrer em três níveis. Ao nível da recepção, durante o atendimento do utente, na colheita do produto biológico pelo técnico de colheitas e ainda na secção onde se irá analisar a amostra.

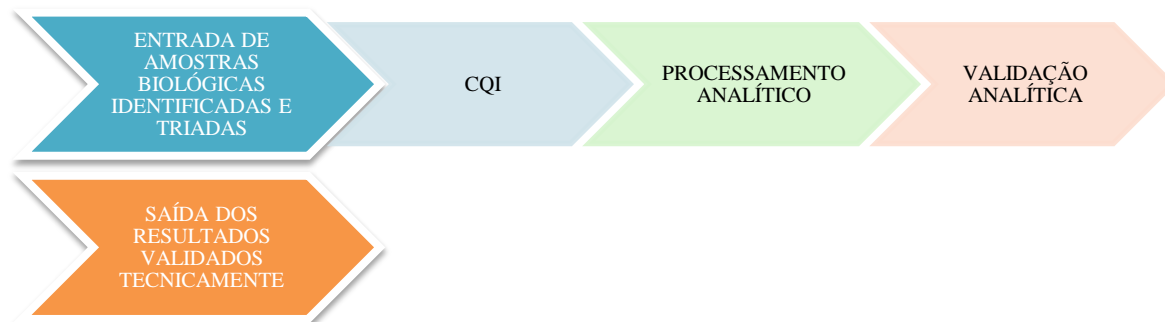
Assim, é da responsabilidade da recepção rejeitar amostras que não tenham sido colhidas em recipiente adequado ou que não cumpram os requisitos necessários.

O técnico de colheita deve proceder à rejeição da amostra, sempre que na punção venosa se forme coágulo (excepto análise em que só é necessário tubo de soro); quando o volume é insuficiente para a análise a realizar; sempre que as amostras se encontrem em tubos que não são adequados para a análise (troca de tubos/etiquetas) e sempre que se verifique que o utente não se encontra nas condições específicas para realizar a análise (jejum correcto).

Na secção são rejeitadas todas as amostras que não estejam identificadas ou em que a identificação não seja perceptível; amostras lipémicas, hemolisadas ou ictéricas, consoante a análise a realizar; amostras de sangue total coaguladas ou com micro-coágulos; sempre que a amostra não apresente volume suficiente para a análise e amostras em que os resultados sugiram que há interferência, mas que esta não tenha sido identificada anteriormente.

FASE ANALÍTICA

Esta fase engloba todo o processo analítico desde a execução analítica pelos equipamentos automatizados ou pelas técnicas manuais até à validação técnica dos resultados. O controlo de qualidade interno (CQI) é aplicado em todas as etapas do processo.



Antes do processo analítico é realizado nos vários equipamentos o controlo de qualidade interno. Este é validado segundo as normas descritas pelas Instruções Técnicas (IT).

O processamento analítico é realizado seguindo as determinações específicas de cada equipamento, pela bula de cada técnica ou pela IT respectiva.

A preparação, utilização, segurança e conservação dos reagentes assim como a calibração analítica a executar está descrita nas bulas ou IT respectivas.

A aceitação ou rejeição dos resultados analíticos é analisada segundo a *leges artis* (“leis da arte médica”). São verificados numa primeira fase a conformidade das condições de execução dos procedimentos, a conformidade com o Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL) e se há conformidade entre os resultados obtidos pelas amostras controlo relacionando-os com os limites definidos para a técnica analítica. Se há conformidade entre todos os pontos referidos anteriormente, podem ser aceites os resultados analíticos, validando-os. Se não se verificar qualquer um dos pontos é realizada a repetição da análise em causa.

A. HEMATOLOGIA

É a área das análises clínicas onde são estudados os parâmetros fisiológicos relativos aos elementos figurados do sangue (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) e órgãos hematopoiéticos, analisando se há normalidade de valores ou por outro lado se há valores patológicos a ter em conta.

A amostra utilizada nos equipamentos de hematologia é sangue colhido em tubo de EDTA para a realização de hemograma, electroforese e hemoglobina glicada (estudo incluído na secção de hematologia) e sangue colhido em tubo de citrato para a realização do estudo da coagulação e da velocidade de sedimentação. Os tubos de citrato variam na proporção de citrato conforme o estudo. Para a coagulação a proporção é de 1:9 (9 volumes de sangue para 1 de citrato) e na VS a proporção é de 1:4 (4 volumes de sangue para 1 de citrato).

1. Equipamentos

1.1. Advia 2120i, com módulo de veterinária

O funcionamento deste equipamento (Figura 2) é bastante simplificado, uma vez que o processamento da amostra é automático, permitindo aumentar o rendimento. Outro benefício deste aparelho é a integração do módulo de veterinária, que permite também de forma automática analisar amostras de animais. Este equipamento tem a capacidade de analisar 120 amostras por hora.

Antes de analisar a amostra esta é identificada assim como os testes a serem realizados. A amostra pode ser analisada por aspiração automática, em tubo fechado ou em tubo aberto. Este equipamento apresenta cinco câmaras onde ocorre a reacção citoquímica da amostra e dos reagentes. A câmara de reacção de Hemoglobina, BASO, RBC, RETIC e Perox.

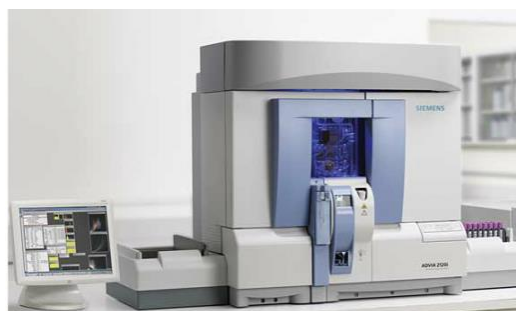


Figura 2 – Representação do equipamento Advia 2120i. Adaptado de <https://www.healthcare.siemens.pt/hematology/systems/advia-2120-hematology-system-with-autoslide>.

A medição e dispersão celular é realizada pela dispersão e absorção de luz promovida pela lâmpada de tungsténio-alogénio localizada no fluxo Perox. No canal RBC é utilizado um díodo de laser que foca o fluxo celular dos glóbulos vermelhos.

Utiliza como coloração a peroxidase que permite uma boa diferenciação dos vários tipos celulares. É feita uma diferenciação citoquímica entre as células da linhagem mielóide e linfóide e a contagem exacta das plaquetas, permitindo excluir falsos diagnósticos provocados por glóbulos vermelhos microcíticos ou pelos fragmentos celulares.

São avaliados na contagem sanguínea completa (CBC): WBC (glóbulos brancos - GB), RBC (glóbulos vermelhos - GV), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração média de hemoglobina corpuscular), RDW (coeficiente de dispersão eritrocitária), HDW (distribuição de hemoglobina), CH, CHDW e PLT (plaquetas). Os resultados diferenciais de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e LUC são avaliados resultado absoluto e em percentagem. Os resultados plaquetários englobam: Plaquetas, MPV, PDW e PCT. Ao nível dos resultados dos reticulócitos são avaliados a % de reticulócitos, #RETIC, MCV_r, CHCM_r e CH_r.

Os resultados morfológicos são avaliados no canal WBC (GB) e RBC (GV). O canal WBC avalia os desvios à esquerda, os linfócitos atípicos, a presença de blastos, os granulócitos imaturos e a deficiência em mieloperoxidase. O canal RBC avalia a anisocitose, macro e microcitose, HC VAR, hipocromia, sombras de GV, NRBC, aglomerados plaquetários e plaquetas gigantes.

Para este aparelho são fornecidos 3 níveis de controlo, baixo, normal e alto. Estes controlos são usados diariamente, sendo um dos níveis usado no início do dia de trabalho e o outro de 20 em 20 amostras. O controlo normal é sempre utilizado e mensalmente varia-se entre controlo baixo e alto.

Os glóbulos vermelhos (GV) com tamanho normal são classificados como normocíctos. A este parâmetro corresponde ao Volume Globular médio (VGM). É representado pela fórmula: $VGM (fL) = \frac{Ht}{GV}$ (Ht corresponde ao Hematócrito em L/L e GV em $10^{12}/L$). As alterações de tamanho dos glóbulos vermelhos que estão na origem de patologias são a microcitose e a macrocitose (tabela 2). Pode-se verificar ainda uma anisocitose quando existem GV microcíticos e macrocíticos, podendo haver predomínio de um deles, apesar de valores normais.

Tabela 2 – Situações patológicas associadas às alterações de tamanho dos Glóbulos Vermelhos

Alteração ao tamanho dos GV	Situações patológicas associadas
Microcitose: GV diminuem de tamanho com $VGM < 80fL$.	Anemia por deficiência em ferro; Anemia sideroblástica; Anemia da doença crónica; Talassémias; Intoxicação por chumbo e Deficiência em vitamina B6.
Macrocitose: GV aumentam de tamanho com $VGM > 96 fL$.	Anemia megaloblástica; Anemia aplásica; Doença hepática; Cirrose; Alcoolismo crónico; Síndromes mielodisplásicas e como consequência do tratamento com quimioterapia.

Para análise da série eritrocitária também é utilizado o coeficiente de dispersão eritrocitária, que avalia a distribuição do volume eritrocitários. Resultados superiores a 14,5% são indicativos de anisocitose.

Os glóbulos vermelhos que não apresentam alterações de cor são classificados como normocrómicos. A cromia é avaliada pela Concentração de hemoglobina globular média (CHGM), ou seja, é a concentração média de hemoglobina de um indivíduo por glóbulo vermelho. É expressa pela fórmula: $CHGM \left(\frac{g}{dl}\right) = \frac{Hb}{Ht}$ (Hb corresponde à hemoglobina em g/dl). Na tabela 3, estão descritas as patologias associadas às alterações de cromia.

Tabela 3 – Situações patológicas associadas à alteração de cor dos Glóbulos Vermelhos

Alteração à cor dos GV	Situações patológicas associadas
Hipocromia: diminuição da concentração de hemoglobina nos GV com CHGM < 32g/dl.	Anemia da doença crónica; Deficiência em ferro e Talassémias.

Não existe hiperchromia, mas sim esferocitose (alteração de forma dos glóbulos vermelhos). Pode ser verificada uma anisocromia, quando estão presentes glóbulos vermelhos hipocrómicos e normocrómicos. Esta situação é associada a anemias sideroblásticas, anemias por deficiência em ferro em tratamento ou doenças inflamatórias em desenvolvimento ou regressão.

Outro parâmetro a ter em conta nos índices eritrocitários é a Hemoglobina Globular média (HGM), ou seja, o peso médio de hemoglobina num glóbulo vermelho médio por indivíduo. É representado pela fórmula: $HGM(pg) = \frac{Hb}{GV}$.

A alteração da forma dos Glóbulos vermelhos é designada de poiquilocitose. Acontece quando os glóbulos vermelhos apresentam formas muito variadas e está associada a anemias ferropénicas, anemias megaloblásticas, anemias hemolíticas, talassémias e mielofibrose. Na tabela 4 é realizada a associação entre as patologias que resultam da forma alterada dos glóbulos vermelhos.

Tabela 4 – Situações patológicas associadas à alteração de forma dos Glóbulos Vermelhos

Alteração à forma dos GV	Situações patológicas associadas
Esferócitos	Esferocitose hereditária; Doença hemolítica do recém-nascido (por incompatibilidade ABO); Reação a transfusão sanguínea; Anemia hemolítica auto-imune e Queimadura grave (com a presença de microesferócitos).
Eliptócitos	Eliptocitose hereditária; Anemia megaloblástica; Anemia ferropénica e Talassémia.
Estomatócitos	Estomatocitose hereditária; Alcoolismo e cirrose alcoólica; Doença hepática obstrutiva e Desequilíbrio electrolítico.
Pinch cells ou Knizocytes	Anemia hemolítica; Hemoglobinopatia e Pancreatite.
Dianócitos ou Target cells	Hemoglobinopatia; Talassémia; Drepanocitose; Doenças da Hb C ou SC ou S (β -talassémia); Doença hepática; Anemia ferropénica; Anemia hemolítica e após esplenectomia.
Drepanócitos ou células falciformes	Anemia falciforme; Doença da Hb S (homozigotia) e Hemoglobinopatia.
Acantócitos ou Spur cells	Acantocitose hereditária (abetalipoproteinémia); Anemia a “spur cells”; Doença hepática; Após esplenectomia; Má absorção lipídica e Anorexia nervosa.
Equinócitos	Insuficiência renal; Urémia e Carcinoma do estômago. *Podem representar artefactos.
Dacriócitos	Talassémia; Anemia ferropénica; Anemia megaloblástica; Mielofibrose; Esplenomegália e Doença renal.
Queratinócitos	Anemia hemolítica microangiopática; Coagulação intravascular disseminada (CID) e Anemia hemolítica secundária a implantes.
Esquisócitos	Anemia hemolíticassecundária a implantes; Anemia hemolítica microangiopática; Coagulação intravascular disseminada (CID); Talassémia e Queimadura grave.

Os GV podem ainda ter outras alterações que não sejam propriamente a sua conformação de que são exemplo as inclusões eritrocitárias, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 – Situações patológicas associadas às inclusões eritrocitárias

Inclusões eritrocitárias dos GV	Situações patológicas associadas
Pontuado basófilo: grânulos finos e redondos azul-arroxeados por todo o GV	Perturbações da eritropoiese; Intoxicação por chumbo; Alteração da biossíntese da Hb; Talassémia; Drepanocitose; Anemia megaloblástica; Anemia sideroblástica; Doença hepática e Infecção bacteriana severa.
Anel de Cabot: inclusão ovalada num GV com coloração vermelho-violáceo.	Anemia perniciosa e Intoxicação por chumbo.
Corpos de Howell-Jolly: inclusões redondas bem visíveis e que coram de azul escuro/púrpula.	Atrofia esplénica após a esplenectomia; Anemia megaloblástica; Anemia ferropénica e Anemia hemolítica.
Corpos de Heinz: inclusões que se encontram junto à membrana que podem levar à sua hemólise.	Deficiência em G6PD e outras enzimopatias dos GV; Anemia hemolítica secundária a intoxicação com drogas oxidantes e Hemoglobinopatia (β -talassémia).
Inclusões de Hb H: tetrâmeros das cadeias β e são caracterizados por várias inclusões esféricas.	Doenças da hemoglobina H (α -talassémia); Doenças da hemoglobina H, adquirida (síndrome mieloproliferativo ou mielodisplásico) e Anemia sideroblástica refratária.
Cristais de Hb C: inclusões angulares ou em forma de roda e podem ser localizados intra ou extracelularmente.	Doença da hemoglobina C nos homozigóticos e nos heterozigotos Hb SC.
Corpos de Pappenheimer: grânulos formados de depósitos de ferro, que se dispõe em grupos à periferia dos GV e são altamente basófilos.	Anemia sideroblástica; Anemia por sobrecarga de ferro; Anemia hemolítica; Talassémia; Hipoesplenismo e após esplenectomia.

Quando à distribuição dos glóbulos vermelhos são consideradas como alterações os rouleaux e a aglutinação, como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Situações patológicas associadas à alteração de distribuição dos Glóbulos Vermelhos

Alteração à distribuição dos GV	Situações patológicas associadas
Rouleaux: empilhamento dos glóbulos vermelhos que tem como consequência o aumento da VS.	Aumento das proteínas plasmáticas (fibrinogénio e globinas) na gravidez; Inflamação; Infecção e Mieloma.
Agglutinação: amontoados irregulares de GV devido à ligação dos anticorpos aos antígenos membranares.	Exposição a variados anticorpos; Anemia hemolítica auto-imune e Doença das aglutininas frias – crioaglutininas.

Ainda na série vermelha são avaliados os reticulócitos. Quando há aumento da eritropoiese há aumento de reticulócitos no sangue periférico e consequentemente eritroblastos. Na anemia hemolítica do recém-nascido em que há incompatibilidade feto-maternal de Rh, existem vários eritroblastos.

Os glóbulos brancos (GB) – leucócitos, são avaliados pela fórmula leucocitária que pode ser representada por valores em forma absoluta ou relativa. A fórmula leucocitária avalia os neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

A linhagem granulocítica é composta por: mieloblasto; promielócito; mielócito; metamielócito, neutrófilo em banda e neutrófilo segmentado. Os neutrófilos podem ser classificados pela sua segmentação, isto é, hiposegmentação com desvio à esquerda, em que o neutrófilo se encontra em banda ou tem dois lóbulos, ou hipersegmentação com desvio à direita em que o neutrófilo pode apresentar desde 4 a 6 lóbulos. As alterações morfológicas que os neutrófilos podem apresentar são: granações tóxicas, corpúsculos de Döhle, Pseudo-Pelger_Huët, vacuolização tóxica, hipersegmentação e gigantismo celular. As alterações quantitativas dos glóbulos brancos também estão associadas a patologias, como demonstrado na tabela 7.

Tabela 7 – Situações patológicas associadas às alterações quantitativas dos Glóbulos Brancos

Alterações quantitativas dos GB	Situações patológicas associadas
Neutrofilia: aumento do número de neutrófilos circulantes.	<ol style="list-style-type: none">1. Causa primária<ol style="list-style-type: none">a. Hereditária;b. Idiopática crónica;c. Outros.2. Causa secundária<ol style="list-style-type: none">a. Infecção;b. Inflamação crónica;c. Neoplásica (leucemia mielóide crónica).
Neutropénia: diminuição do número de neutrófilos circulantes.	<ol style="list-style-type: none">1. Congénita<ol style="list-style-type: none">a. Síndrome Kostmann's.2. Adquirida<ol style="list-style-type: none">a. Induzida por drogas anti-inflamatórias ou anti-bacterianas.3. Imune<ol style="list-style-type: none">a. LES – Lúpus eritomatoso sistémico.4. Infecciosa<ol style="list-style-type: none">a. HIV.

São alterações quantitativas dos eosinófilos, a eosinofilia, com o aumento do número de eosinófilos no sangue periférico. Este aumento tem como causas as situações de doença alérgica, doenças parasitárias e também acontece na recuperação de uma infecção aguda. A linhagem granulocítica é composta por: promielócito eosinófilo; mielócito eosinófilo; metamielócito eosinófilo.

Os basófilos têm a função de intervir no processo de inflamação aguda e nas reacções de hipersensibilidade. A linhagem granulocítica é composta por: promielócito basófilo; mielócito basófilo e metamielócito basófilo.

As alterações quantitativas dos linfócitos são a linfocitose, quando há aumento do número de linfócitos em circulação. Este aumento está associado a infecções agudas de origem viral ou bacteriana; a infecções crónicas (como a tuberculose) e estar associado a causas primárias, como a leucemia linfoblástica aguda ou o linfoma não-Hodgkin. Os linfócitos intervêm na resposta imunológica humoral através dos linfócitos B e na resposta

imunológica celular através dos linfócitos T. A linhagem linfocítica é composta por: linfoblasto; prolinfócito; pequeno linfócito e grande linfócito.

As alterações quantitativas dos monócitos são a monocitose, quando há aumento do número de monócitos na circulação. Este aumento é devido a infecções bacterianas crônicas, doenças do tecido conectivo (artrite reumatóide) ou devido a infecções por protozoários. Os monócitos têm como funções a quimiotaxia, a fagocitose, a resposta inflamatória e imunitária, a actividade antitumoral e a regulação da hematopoiese. A linhagem monocítica é composta por: monoblasto; promonócito e monócito.

As alterações quantitativas das plaquetas são a trombocitose e a trombocitopenia. Estas são associadas a algumas situações patológicas, como demonstrado na tabela 8.

Tabela 8 – Situações patológicas associadas às alterações quantitativas das plaquetas

Alterações quantitativas das plaquetas	Situações patológicas associadas
Trombocitose: aumento do número de plaquetas circulantes.	1. Doenças mieloproliferativas e Doenças inflamatórias crônicas.
Trombocitopénia: diminuição do número de plaquetas circulantes.	1. Diminuição de plaquetas e megacariócitos <ul style="list-style-type: none"> a. Infiltração da medula óssea; Linfoma e Infecção viral. 2. Aumento da destruição de plaquetas <ul style="list-style-type: none"> a. Aumento do consumo e Patologias imunes ou não-imunes. 3. Aumento do sequestro esplénico <ul style="list-style-type: none"> a. Esplenomegália.

São alterações qualitativas das plaquetas a anisocitose plaquetária, os agregados plaquetários, a desgranulação e o satelismo plaquetário. A linhagem plaquetária ou megacariocítica é composta por: megacarioblasto; megacariócito basófilo; megacariócito granuloso; megacariócito plaquetário e plaqueta. As plaquetas têm a função de protecção do endotélio vascular, intervêm na formação do rolhão plaquetário e retracção do coágulo e no processo inflamatório.

Tabela 9 - Valores de referência do hemograma no adulto

Parâmetro	Valores de referência
Hemoglobina	<u>Homem</u> : 13,5 – 18 g/dL <u>Mulher</u> : 12,5 – 16 g/dL
Eritrócitos	<u>Homem</u> : $4,70 \times 10^{12}$ – $6,0 \times 10^{12}/L$ <u>Mulher</u> : $4,20 \times 10^{12}$ – $5,40 \times 10^{12}/L$
Hematócrito	<u>Homem</u> : 42,0 – 52,0% <u>Mulher</u> : 37,0- 47,0%
VGM	80-96 fL
HGM	27-32 pg
CHGM	32-36g/dl
RDW	11,5-14,5 %
Leucócitos	$4,0 \times 10^9$ – $11,0 \times 10^9/L$
Neutrófilo	$1,5 \times 10^9$ – $6,6 \times 10^9/L$
Eosinófilos	$0,1 \times 10^9$ – $1,0 \times 10^9/L$
Basófilos	$0,01 \times 10^9$ – $0,1 \times 10^9/L$
Linfócitos	$1,5 \times 10^9$ – $3,5 \times 10^9/L$
Monócitos	< $0,1 \times 10^9/L$
Plaquetas	150×10^9 – $400 \times 10^9/L$

1.2. Hi-Auto (HA 8160)

Este equipamento (Figura 3) permite quantificar a hemoglobina glicada, assim como as fracções de hemoglobina A1; A2 e F que constituem os resultados apresentados na electroforese de hemoglobinas.

Apresenta como metodologia a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). Este princípio é baseado na ligação da glicose ao grupo amina terminal da cadeia α que leva a alterações na carga total da hemoglobina. A fracção glicada tem assim uma migração mais rápida. Neste aparelho é também promovida a separação das diferentes fracções de hemoglobinas pela redução das partículas que se encontram na fase estacionária (localizada na coluna cromatográfica).



Figura 3 – Representação do equipamento Hi-Auto (HA 8160). Adaptado de <http://www.medicalexpo.com/prod/menarini-diagnostics/product-79119-628131.html>

Este aparelho faz automaticamente a hemólise da amostra a processar. Caso seja necessário analisar uma amostra com pouco volume é realizada a hemólise manual segundo o procedimento técnico descrito no manual do equipamento e selecciona-se o método de análise a efectuar.

São utilizados dois níveis de controlo, alto e baixo. Estes controlos são utilizados diariamente, sendo um deles utilizado no início do dia de trabalho e outro no final. Estes controlos são distribuídos em alíquotas que são depois congeladas. A hemólise é manual e faz-se quando se procede à análise do controlo.

A avaliação da hemoglobina glicada depende da concentração de glucose no sangue e do tempo médio de vida dos glóbulos vermelhos (120 dias). Esta análise representa valores que antecedem em 6 – 8 semanas a determinação do valor de HbA1c. Os valores normais encontram-se entre 4,0 – 6,0 %. O controlo da diabetes, além da HbA1c é feito pelo doseamento da glucose no soro e na urina e pela avaliação dos resultados da PTOG. Este é um método de análise bioquímico, mas neste laboratório está incluído na secção da hematologia, uma vez que também nos permite realizar a electroforese de hemoglobinas.

Na electroforese de hemoglobinas são avaliadas HbA1, HbA2 e HbF. A obtenção de resultados com outras variáveis de hemoglobinas que não as descritas não são avaliadas neste laboratório. Alterações a estas fracções de hemoglobinas indicam hemoglobinopatias

associadas a variantes de hemoglobina como a drepanocitose ou talassémias (β , α e persistência hereditária da hemoglobina fetal). São valores normais para HbA1 95-98%, para a HbA2 2,5% e para a HbF 1%.

1.3. Vesmatic 30 Plus

Este aparelho (Figura 4) é utilizado para a medição da VS. É um método automático que utiliza a metodologia de Westergren, onde são utilizados tubos específicos, que contêm 0,36 ml de citrato de sódio a 0,105 M. o tempo de realização da análise é de cerca de 26 minutos para o valor da 1ª hora e de 46 minutos para o valor de 2ª hora.

Possuí dois níveis de controlo. Nível de controlo com valor normal e nível de controlo com valor patológico. Estes controlos são efectuados todos os dias antes de se iniciar a análise das amostras.



Figura 4 – Representação do equipamento Vesmatic 30 Plus. Adaptado de <http://www.medicaexpo.es/prod/diesse-diagnostica-senese/product-68223-720535.html>

Entende-se por VS a velocidade de queda dos elementos figurados do sangue em suspensão de plasma durante uma hora. Este processo consiste em três etapas: a agregação, com a formação de rouleaux de glóbulos vermelhos; a sedimentação, com a queda desses rouleaux a uma velocidade constante e a sedimentação final, onde há acumulação dos glóbulos vermelhos no fundo do tubo.

A VS apresenta resultado patológico quando há aumento ou diminuição em relação ao valor normal. O valor normal até aos 50 anos é de 10 mm para os homens e 13 mm para as mulheres. Depois dos 50 anos há aumento da VS por factores fisiológicos e nesse caso os valores normais para os homens são 13 mm e para as mulheres 20 mm. Estes valores são sempre obtidos após 1 hora. As situações patológicas relacionadas com o aumento da VS são: infecções agudas e crónicas, inflamações, doenças reumáticas, anemias, hemólise, necrose tecidual e neoplasias. A diminuição da VS está relacionada com as poliglobulias, as policitémias, a hipofibrinogénemia, a diminuição das globinas plasmáticas e situações associadas a poiquilocitose (alteração de forma dos glóbulos vermelhos).

A VS é afectada por factores globulares (formação de rouleaux e alterações do número, forma e tamanho dos GV), por factores plasmáticos (viscosidade do sangue, aumento de fibrinogénio ou globinas plasmáticas) e por factores mecânicos (tipo de tubo utilizado, correcta manipulação da amostra, temperatura do aparelho, tipo de anticoagulante, etc).

1.4. Sysmex CA 500

Este aparelho (Figura 5) permite avaliar os parâmetros TP, APTT, INR e o fibrinogénio. Utiliza um método de detecção de luz difusa e um método colorimétrico.

Como controlos são utilizadas uma Pool patológica (INR > 2,0) e uma Pool 100%. Estas Pool's são realizadas nos laboratório a partir de plasma dos nossos doentes, garantindo assim um controlo mais apertado. Estas Pool's são congeladas e utilizadas diariamente no início do dia e sempre que se utilize um novo reagente com nova hidratação. Caso haja pedidos de fibrinogénio é realizado controlo com Citrol 1. Mensalmente são realizados Citrol 1, 2 ou 3 e sempre que é feita a calibração do tempo de protrombina (TP), são realizados os três níveis. Os valores de desvio padrão utilizados são os facultados pelo fornecedor.



Figura 5 – Representação do equipamento Sysmex CA 500. Adaptado de <http://www.medlab.com.cy/index.php/products/lab-automation/hemostasis/diamond-sysmex-coagulation-ref>

A hemostase é dividida em hemostase primária, secundária e terciária. A sua avaliação ocorre através da via intrínseca, via extrínseca e via comum.

Na hemostase primária ocorre a formação de trombo pela adesão de plaquetas no local de lesão.

A hemostase secundária é caracterizada pelo processo de coagulação, que ocorre pela via intrínseca, via extrínseca e via comum (Figura 6).

A via intrínseca é avaliada pelo tempo de tromboplastina parcialmente activada (APTT). Caracteriza-se pelo tempo que demora a recalcificação do plasma citratado e pobre em plaquetas, na presença de fosfolípidos e de um activador de superfície (caulino, celite ou sílica micronizada). Através do APTT são avaliados os factores VIII, IX, XI, XII, X, V, a protrombina e o fibrinogénio. Esta análise é utilizada no controlo da terapêutica com heparina e na detecção de deficiências congénitas ou adquiridas relacionadas com estes factores, nomeadamente a doença do factor de von Willebrand, a Hemofília A e B.

A via extrínseca é avaliada pelo tempo de protrombina (PT). É caracterizada pelo tempo que demora a formação do coágulo de fibrina, ou seja, é o tempo que demora a

recalcificação do plasma citratado e pobre em plaquetas na presença de elevada quantidade de tromboplastina e iões de cálcio. Permite avaliar a via extrínseca e comum da coagulação, nomeadamente os factores VII, X, V, a protrombina e o fibrinogénio. Serve para controlar os utentes que necessitam de anticoagulantes orais, além de ser uma análise de rotina que permite avaliar o sistema de coagulação do utente por exemplo caso este necessite ser operado. As patologias associadas a alterações de PT são: doença hemorrágica do recém-nascido, deficiência de vitamina K ou tratamento com seus antagonistas, deficiências congénitas associadas aos factores a cima descritos e coagulação intravascular disseminada.

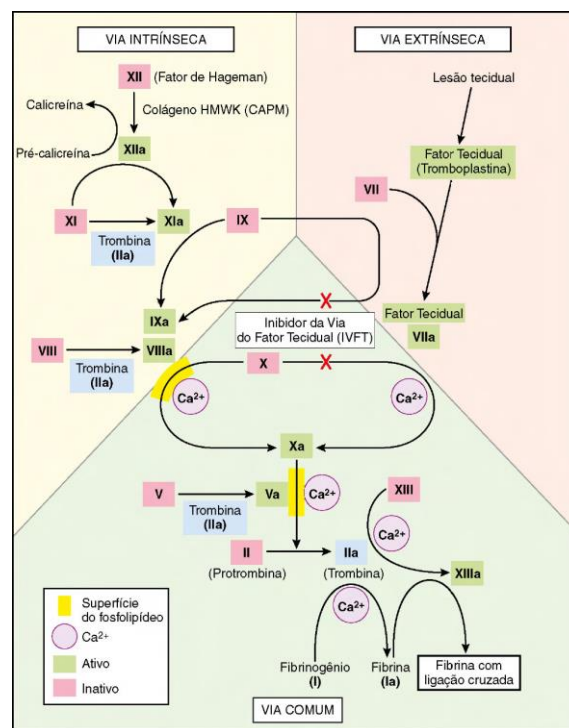


Figura 6 - Representação da cascata da coagulação. *Adaptado de Robinns, Patologia Básica 2013.*

Na monitorização da terapêutica com antagonistas da vitamina K, avalia-se o tempo de protrombina em segundos – International Normalised Ratio (INR). Este é calculado pela razão: $INR = \left(\frac{PT}{MNPT}\right)^{ISI}$, onde MNPT corresponde aos valores de PT obtidos em amostras normais e ISI corresponde ao índice de sensibilidade internacional.

A via comum é avaliada pelo valor directo do Fibrinogénio. É nesta via que a trombina degrada o Fibrinogénio com libertação de monómeros fibrina. Também a trombina promove a activação do factor XIII que estabiliza os polímeros de fibrina. Avalia o processo de transformação de fibrina e a via da trombina.

A última etapa é a hemostase terciária, onde há destruição do coágulo de fibrina para evitar a oclusão dos vasos sanguíneos. Esta via pode ser avaliada através de D-dímeros (esta análise não é realizada no nosso laboratório).

2. Técnicas manuais

2.1. Grupo sanguíneo – Método Beth-Vicent

É um método de aglutinação entre anticorpo e antígeno. São utilizados os reagentes anti-A e anti-B e a amostra utilizada é sangue total colhido em EDTA. O resultado deriva da aglutinação formada pela adição de sangue aos reagentes.

A determinação do grupo AB0 consiste na presença à superfície dos glóbulos vermelhos de antígenos A e B e de anticorpos no soro anti-A e anti-B, que são determinados pelo cromossoma 9.

Assim para o grupo sanguíneo A, as células apresentam antígeno A e soro com anticorpo anti-B. No grupo sanguíneo AB, apresenta antígeno A e B e não apresenta anticorpos. No grupo sanguíneo 0, não apresenta antígenos e tem anticorpos anti-A e anti-B.

2.1.1. Factor Rh

Para o factor Rh, o processo é semelhante ao descrito anteriormente, apenas utiliza-se como reagente o anti-D (IgG + IgM).

Para a confirmação do factor Rh⁻, é utilizado o Card da casa comercial DIAMED/BIO RAD.

Prepara-se uma suspensão de células a 5% (50 µl de sangue + 0,5 ml de ID-Diluent 1), que vai a incubar 10 minutos à temperatura ambiente. Coloca-se 10 µl no Card ID-GEL ANTI-D seguindo-se a centrifugação na centrífuga DIAMED e fazer a leitura dos resultados.

2.1.2. Factor Du

É preparada uma suspensão de 3-5% GV a testar que devem ser previamente lavados com soro fisiológico 3-4 vezes (adicionar por exemplo 50 µl de GV a 950 µl de soro fisiológico).

Num tubo devidamente identificado é colocada uma gota de reagente anti-D e uma gota da solução anteriormente preparada. Deve-se misturar e incubar a 37°C durante 15 minutos.

Lavar com soro fisiológico duas vezes rejeitando completamente o sobrenadante na última lavagem.

Adicionar 2 gotas de globina anti-humana de Coombs, misturar bem e centrifugar a 1000 rpm durante 20 segundos.

Agitar o tubo com cuidado e verificar macro ou microscopicamente a existência de aglutinação (Du positivo).

2.2. Teste de Coombs

É utilizado um método de centrifugação em gel, com o Card ID- LISS/COOMBS. Os reagentes são ID DIA-CELL I e ID DIA-CELL II e a cada um é adicionado sangue total com EDTA.

Este teste serve para avaliar os anticorpos circulantes que actuam contra os glóbulos vermelhos levando a hemólise.

É utilizado nas mulheres grávidas na detecção de anti-D em mães Rh⁻ ou antes de ser realizada uma transfusão sanguínea.

2.3. Estudo morfológico de sangue periférico

Para efectuar o esfregaço (Figura 7) deve-se colocar uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina limpa. Com o auxílio de outra lâmina a formar um ângulo de 45° apoiar na gota e de maneira firme e com movimento uniforme espalhar a gota até esgotar o sangue. O esfregaço deve ser fino e conter cabeça e cauda e corpo. É no centro que vão estar agrupados os pequenos linfócitos e nas bordas irão estar as células monocíticas e granulocíticas. Deve-se deixar secar bem ao ar antes de fazer a coloração, para evitar contaminação e perda dos elementos figurados do sangue.

É utilizada a coloração Hemacolor-Merck. Colocar as lâminas na Solução Hemacolor 1 por 5 vezes durante 1 segundo; de seguida na Solução Hemacolor 2 por 3 vezes durante 1 segundo; posteriormente na Solução Hemacolor 3 por 6 vezes 1 segundo e finalmente na Solução Tampão (diluição de 1 ampola de Titrisol pH 7.2 com água destilada até perfazer 1000 ml) durante 45 segundos. Deixar secar ao ar e observar ao microscópio.

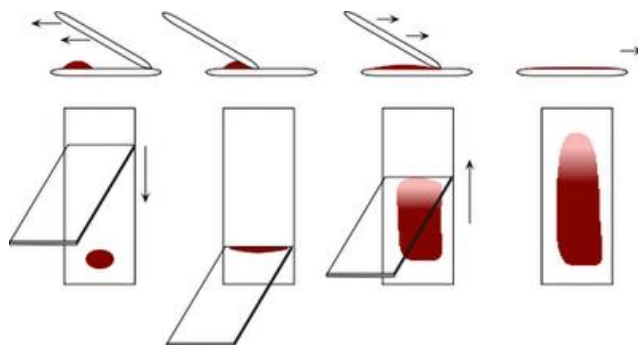


Figura 7 – Representação da execução de esfregaço de sangue periférico.
Adaptado de <http://biologia206.blogspot.pt/2011/07/tecnica-de-esfregaco-de-sangue.html>

2.4. Micrométodo – VS

É utilizado quando a quantidade de amostra não é suficiente para os tubos de citrato que são utilizados no aparelho automático.

Faz-se uso de uma micropipeta, onde é pipetado citrato sódico até à primeira marca (70 na escala de leitura) e pipetado sangue total (colhido com EDTA) até à última marca. O conteúdo total da micropipeta deve ser escoado sobre uma lâmina de vidro de modo a misturar bem o citrato com o sangue, voltando a pipetar até à marca 0 da escala de leitura.

A micropipeta é colocada num suporte adequado e os resultados são lidos após 1 hora.

B. MICROBIOLOGIA

Na secção de Microbiologia são analisados todos os produtos biológicos, para a pesquisa de bactérias, fungos ou parasitas. É nesta área também que se testa a sensibilidade de determinados microrganismos aos antibióticos, quando identificados em cultura.

Os produtos biológicos analisados nesta secção são principalmente fezes, urinas e exsudados. Na urina é feita sementeira em placa para a verificação de infecções bacterianas ou micológicas, variando o método de trabalho consoante o que é prescrito. Os exsudados consoante os seus tipos também são feitos em diversas sementeiras (consoante a prescrição médica), para posteriormente identificarmos o microrganismo causador de infecção.

É uma secção onde a maioria do trabalho ainda é manual. Todos os produtos biológicos são semeados nas diversas placas manualmente, assim como a observação do seu crescimento em placa e posterior decisão é feita pelo Técnico de Análise ou pelo Especialista.

A única automatização desta secção consiste no equipamento Vitek 2 Compact, que após todo o processo referido acima é utilizada para a identificação de patógenos e realização de antibiogramas para testar a sensibilidade aos antibióticos.

1. Equipamentos

1.1. Vitek 2 Compact

É neste aparelho (Figura 8) que se procede à identificação das estripes obtidas através do crescimento em placa e onde são realizados os antibiogramas.

No Biolabor, este aparelho é utilizado na identificação de Cocos Gram Positivos e Negativos, Bacilos Gram Positivos e Negativos e Leveduras. O resultado pode dar origem à identificação de uma única espécie com boa discriminação ou pode dar origem a um padrão de espécies que podem estar estritamente relacionadas, neste caso é necessário realizar testes

suplementares para chegar à identificação correcta da espécie. Deve-se sempre também ter em conta o resultado obtido do crescimento em placa antes da identificação, assim como a história clínica do utente. Podemos também não obter nenhuma identificação, neste caso deve ser repetido todo o procedimento, algumas vezes até pode ser necessário a colheita de uma nova amostra, pois este resultado pode surgir de uma contaminação, mau manuseamento da amostra ou má execução do procedimento técnico.

Existem cartas específicas utilizadas para a identificação. GP é utilizada para todos os Gram Positivos, GN para todos os Gram Negativos e YST para as leveduras.

Os antibiogramas podem ser realizados na mesma altura que a identificação, como demonstra a figura 9, a primeira carta, com a palhinha azul é para a identificação e a segunda é para o antibiograma da estirpe identificada. Na terceira posição apenas está a carta de antibiograma, uma vez que já foi determinada a espécie, por exemplo, *Escherichia coli* é identificada pelas placas de crescimento, pois tem cor e textura característica no meio cromogénico utilizado. No nosso laboratório apenas no caso de *E. coli* se realiza o antibiograma sem fazer identificação através das cartas de identificação.

Para realização de antibiogramas as cartas utilizadas são ASTN244, quando são identificados Gram Negativos; ASTP 586, quando identificados Gram Positivos,



Figura 8 – Representação do equipamento Vitek 2 Compact. Adaptado de <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>



Figura 9 – Representação das cartas de identificação e antibiograma. Adaptado de <https://www.biomerieuxuniversity.com/vitek-2-compact-test-card-setup.html>

nomeadamente no caso de *Enterococcus spp.* e *Streptococcus spp.*; ASTP619, quando identificados Gram Positivos, como no caso de *Staphylococcus spp.*.

No resultado do antibiograma são apresentadas as susceptibilidades aos antibióticos formalizados nas cartas e é da responsabilidade do especialista a escolha de quais os antibióticos apresentar ao médico, tendo em conta qual o produto que foi analisado e claro a resistência/sensibilidade que o organismo apresenta perante os antibióticos.

Para controlo do equipamento são realizadas mensalmente 3 a 4 estirpes de bactérias (ATCC), para os processos de identificação e de teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA). É também a partir destas estirpes que se fazem lâminas para o controlo da coloração Gram.

Para a identificação, é utilizado o ATCC de *Streptococcus thermophilus* para a identificação Gram (+); o ATCC de *Enterobacter cloacae* para a identificação Gram (-) e ATCC de *Campylobacter* para identificação NH.

No teste de sensibilidade aos antibióticos, é utilizado o ATCC de *Escherichia coli* para a carta AST N244; o ATCC de *Staphylococcus aureus* para a carta AST P619 e ATCC de *Enterococcus faecalis* para a carta AST P586.

As amostras de micobacteriologia e parasitologia são utilizadas para fazer lâminas de controlo à coloração de Ziehl.

2. Técnicas manuais

2.1. Exame micológico

Para todas as amostras o exame micológico directo permite observar ao microscópio leveduras e filamento do micélio. Pode ser feita a coloração de Gram ou Giemsa, para observar a presença de elementos fúngicos ou a preparação com Tinta-da-china que coloca em evidência as cápsulas de *Cryptococcus neoformans* (técnica utilizada para LCR e outros líquidos patológicos).

2.1.1. Amostras de urina

O exame micológico directo da urina tem procedimento idêntico para as amostras de fezes, expectoração ou exsudados. É realizada a conjugação de uma gota de produto patológico ou sedimento com soro fisiológico.

No exame micológico cultural é realizada a inoculação de 10 µl de urina sem centrifugação em meio Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (GSGC).

2.1.2. Amostras de fezes

No exame micológico cultural de fezes moldadas é realizada uma suspensão com 1 ml de soro fisiológico e são inoculados 125 µl dessa suspensão em GSGC.

No exame micológico cultural de fezes líquidas é realizada a suspensão com 1 gota de fezes e 4 ml de soro fisiológico e são inoculados 200 µl dessa suspensão em GSGC.

2.1.3. Amostras de expectoração

Para o exame micológico cultural de amostras de expectoração ou de pés é realizada a inoculação da amostra directamente em meio GSGC, em duplicado.

As infecções pulmonares são causadas por *Blastomyces dermatitidis*; *Coccidioides immitis*; *Coccidioides posadasii*; *Histoplasma capsulatum*; *Paracoccidioides brasiliensis* e *Penicillium marneffe*. Estes são fungos dimórficos.

2.1.4. Exsudados

No exame micológico cultural de exsudados é utilizada a zaragatoa directamente para realizar a sementeira em meio de GSGC.

2.1.5. Fâneras

Para o exame micológico directo de amostras de unhas, cabelos e pêlos, o exame micológico directo realiza-se após a clarificação com KOH a 20%, antes de observar ao microscópio.

Para o exame micológico cultural de fâneras é realizada a sementeira directamente da amostra em meio GSGC, em duplicado. Um dos meios serve para a identificação de fungos de crescimento rápido e leveduras e o outro meio serve para a identificação de dermatófitos (fungos de crescimento mais lento).

As infecções micológicas das unhas são denominadas de onicomioses. Os principais agentes responsáveis são: *Scopulariopsis brevicaulis*; *Acremonium spp.* e *Aspergillus spp.*, como fungos dermatófitos e *Alternaria*; *Curvularia*; *Penicillium* e *Trichosporon*, como fungos não-dermatófitos.

As infecções da pele causadas pelos fungos podem ser divididas em 3 tipos. Os Eumicetomas onde actuam os agentes: *Madurella*; *Exophiala dermatitidis*; *Exophiala jeanselmei*; *Acremonium* e *Pseudallescheria boydii*. A Esporotricose de que é responsável o *Sporothrix schenckii*. Finalmente a Cromoblastomicose tem como agentes causais: *Cladophialophora*; *Phialophora verrucosa*; *Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea compacta*.

2.2. Exame parasitológico

2.2.1. Amostras de urina

É utilizado o sedimento após centrifugação e observa-se ao microscópio com ou sem adição de uma gota de Lugol. Também pode ser realizada a coloração Hemacolor-Merck, que permite distinguir melhor a morfologia parasitária

No sedimento urinário o parasita mais frequentemente encontrado é a *Trichomonas vaginalis*.

2.2.2. Amostras de fezes

Inicialmente deve-se confirmar na amostra a presença de parasitas a olho nú.

A amostra deve ser retirada de vários locais com uma espátula e juntar em tubo de vidro com soro fisiológico e agitar. Deve-se colocar num novo tubo $\frac{3}{4}$ da suspensão e adicionar umas gotas de ácido acético e um pouco de éter. O tubo deve ser agitado e centrifugado. É rejeitado o sobrenadante e o sedimento é observado ao microscópio directamente ou com a adição de uma gota de Lugol.

Se as fezes são diarreicas é realizada observação directa em lâmina com a coloração Hemacolor-Merck e Ziehl-Neelsen modificada.

Nas amostras de fezes é realizada a pesquisa de ovos, quistos e parasitas. Os parasitas mais comuns neste tipo de amostra são: *Entamoeba histolytica*; *Entamoeba coli*; *Iodamoeba*

butschlii; *Cryptosporidium parvum*; *Cyclospora cayetanensis*; *Enterocytozoon bieneusi*; *Isospora belli*; *Giardia intestinalis*; *Balantidium coli*; *Ascaris lumbricoides*; *Trichuris trichiura*; *Enterobius vermicularis*; *Necator americanus*; *Strongyloides stercoralis*; *Schistosoma mansoni*; *Schistosoma haematobium*; *Schistosoma japonicum*; *Fasciola hepática*; *Hymenolepis nana*; *Hymenolepis diminuta*; *Taenia solium* e *Diphyllobotrium latum*.

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, é feita a coloração Ziehl-Neelsen modificada, sendo observado ao microscópio na objectiva de imersão os oocistos corados de vermelho vivo.

Para pesquisa de oocistos de *Blastocystis* é feita a coloração Hemacolor-Merck, onde aparecem corados de azul ou a coloração Gram, onde os núcleos periféricos se observam corados de violeta.

2.2.3. Amostras de expectoração

É realizada a homogeneização de parte da expectoração e observa-se ao microscópio entre lâmina e lamela, com a adição de 1 gota de Lugol.

Parasitas susceptíveis de estar presentes em amostras de expectoração são: *Paragonimus*; *Entamoeba histolytica*; *Ascaris lumbricoides* (síndrome de Loeffler); *Ancylostoma duodenale*; *Necator americanus*; *Toxoplasma canis*; *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*; *Schistosoma japonicum*; *Strongyloides stercoralis*; *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*.

2.2.4. Exsudados

No exsudado vaginal e uretral é realizada a observação microscópica do exame a fresco.

No caso de exsudados nasais; faríngeos; oculares ou auriculares, é realizada a observação microscópica dos esfregaços corados pela coloração Hemacolor-Merck.

No exsudado uretral e vaginal o parasita mais frequentemente encontrado é *Trichomonas vaginalis*.

2.3. Exame bacteriológico

2.3.1. Amostras de urinas

O exame bacteriológico directo é realizado a partir do sedimento urinário com a observação ao microscópio dos elementos presentes. Se há leucocitúria ou bacteriúria realiza-se a coloração Gram. Pode ser realizada a coloração Ziehl-Neelsen modificada em caso de

pedido específico ou quando a presença de leucocitúria e hematuria não coincide com a bacteriúria.

No exame bacteriológico cultural é realizada a inoculação de 10 µl de amostra em meio de CLED (meio selectivo) para a contagem de colónias. Em caso de pedido específico de BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes) ou BK é feita a inoculação em meio Löwenstein-Jensen. Pode ainda ser realizada a inoculação em meio Columbia + 5% sangue de carneiro (pedido específico ou sempre que o exame directo o sugerir).

As bactérias Gram – mais frequentemente encontradas em infecções urinárias são: *Escherichia coli*; *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*. Como Cocos Gram + podemos ter *Staphylococcus spp* e *Enterococcus spp*.

A identificação das estirpes é possível através do meio de cultura CPS ID, de forma presuntiva ou directa.

- Colónias rosa, β-glucuronidase + e Indole + correspondem a *E. coli*.
- Colónias castanho claro/escuro, TDA + e Indole - correspondem a *Proteus mirabilis*.
- Colónias castanho claro/escuro, TDA + e Indole + correspondem a *Proteus indologene*, *Morganella* e *Providencia*.
- Colónias azul turquesa, β-glucosidase + correspondem a *Enterococcus*.

As identificações e TSA são feitas pelas cartas de identificação e de susceptibilidade do sistema automatizado VITEK.

2.3.2. Amostras de fezes

No exame bacteriológico directo é realizada a observação ao microscópio a partir da amostra para a pesquisa de eritrócitos e leucócitos com ou sem utilização do azul de metileno. Nas fezes diarreicas é realizada a coloração de Gram para verificar a riqueza da flora intestinal pelo equilíbrio entre Gram + e Gram -.

No exame bacteriológico cultural as fezes líquidas são utilizadas directamente e inoculadas primeiramente em meio SM2/HEKT, em meio Campyloset e em meio Rappaport durante 24H. O meio Rappaport é um meio de enriquecimento que é utilizado para facilitar o crescimento bacteriológico. Após as 24H há passagem do meio Rappaport para o meio SS. No caso de fezes sólidas realiza-se em primeiro lugar uma suspensão em soro fisiológico, sendo o

resto do procedimento semelhante ao acima descrito. No pedido específico de pesquisa de *Staphylococcus* é utilizado o meio Chapman ou Columbia.

As bactérias pesquisadas na coprocultura são: *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*. A identificação das estirpes e TSA são feitos pelas cartas de identificação e de susceptibilidade do sistema automatizado VITEK.

2.3.3. Amostras de expectoração

No exame bacteriológico directo é utilizada directamente a amostra para observação ao microscópio com a coloração Gram e de Ziehl-Neelsen modificada.

No exame bacteriológico cultural é utilizada directamente a amostra para inocular em meio Columbia + 5% sangue de carneiro e meio Chocolate + PolyViteX.

Sempre que é requisitado o exame cultural de B.K. a amostra é inoculada em meio de Löwenstein-Jensen.

As bactérias presentes em amostras de expectoração e susceptíveis de causar infecções do aparelho respiratório são: *Streptococcus* hemolítico do grupo A; *Streptococcus pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Fusobacterium planti-vincent*; *Klebsiella pneumoniae*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Actinomyces israelii*; *Nocardia asteróides* e *Legionella*.

A identificação das estirpes e TSA são feitos pelas cartas de identificação e de susceptibilidade do sistema automatizado VITEK.

2.3.4. Exsudados

O exame bacteriológico directo é realizado directamente a partir das zaragatoas e é realizada a observação ao microscópio com coloração Gram.

Nos exsudados vaginais e uretrais é sempre realizado o exame bacteriológico, micológico e parasitológico.

No exame bacteriológico cultural é utilizada a amostra contida na zaragatoa para inocular em meio Columbia + 5% sangue de carneiro e em meio Chocolate + PolyViteX. Se há crescimento suspeito em placa de leveduras é realizada a prova de filamentação, que nos permite identificar logo *Candida albicans*.

No exsudado uretral podemos encontrar *Neisseria gonorrhoeae*; *Chlamydia trachomatis*; *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*.

No exsudado vaginal as bactérias que podem causar patologia são: *Gardnerella vaginalis*; *Mycoplasma hominis*; *Ureaplasma urealyticum*; *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*; como levedura *Candida albicans* e como parasita *Trichomonas vaginalis*.

A identificação das estirpes e TSA são feitos pelas cartas de identificação e de susceptibilidade do sistema automatizado VITEK.

Além da sementeira podem ser realizados testes específicos. O MYCOPLASMA IST para a pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* que permite a cultura em meio apropriado fornecido pelo kit e a identificação e TSA específica. O teste CHLAMYDIA para a pesquisa directa de *Chlamydia trachomatis* através do teste rápido imunocromatográfico para pesquisa do antigénio.

2.4. BK DDIRECTO E CULTURAL - MICOBACTERIOLOGIA

2.4.1. Processo de descontaminação das amostras

Pode ser aceite para o exame micobacteriológico, expectorações consideradas “saliva”.

A urina deve ser centrifugada (3 a 4 tubos), rejeitando o sobrenadante e processar o sedimento.

Para proceder ao tratamento da amostra seguir as instruções do Kit para descontaminação destas. Adicionar o tampão de neutralização até viragem da cor, para atingir o pH próximo de 6,8. A centrifugação deve ser efectuada em contentores fechados – tubos de Falcon. Aguardar alguns minutos antes de destapar o tubo e decantar o sobrenadante para um contentor com desinfectante, usar o sedimento para a preparação de lâminas a corar ou para a cultura.

2.4.2. BK directo

Preparar os esfregaços em duplicado e em lâminas novas e com uma gota de albumina bovina para facilitar a adesão, deixar secar, fixar á chama e corar com coloração de Ziehl-Neelsen modificada (BAAR corados de vermelho).

Utilizar a fucsina filtrada e evitar a secagem do esfregaço durante a sua coloração. Examinar cada esfregaço durante 5-15 minutos e 100 campos, antes de dar um resultado negativo. Deve-se evitar que o aplicador do óleo de imersão e a lente da objectiva toquem no esfregaço.

Os resultados possíveis de BK directo estão representados na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados possíveis de B.K. directo

Resultado	ZN (1000X)
Não se observaram BAAR	0
Número exacto de BAAR	1-9 / 100 campos
+	10-99 / 100 campos
++	1-10 / campo
+++	>10 / campo

2.4.3. BK cultural

O sedimento obtido do tratamento da amostra é utilizado para a sementeira (aproximadamente 200 µl) em meio de cultura Löwenstein-Jensen, incubando na estufa durante 60 dias. A incubação ideal é com 10% CO₂.

Os tubos de cultura devem estar inclinados 3-4 dias para que a superfície fique coberta, colocando-se depois na vertical. Deve ser feita a examinação da cultura 1 a 2 vezes por semana e se for detectado crescimento deve ser feito esfregaço para confirmar a presença de BAAR.

Em caso de crescimento positivo devem ser quantificadas as colónias (tabela 11).

Tabela 11 - Resultados possíveis de B.K. cultural

Resultado	Número de colónias
+	<10 colónias
++	10-100 colónias
+++	>100 colónias
++++	Incontáveis

2.5. Pesquisa de *Streptococcus* do grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

Pode ser realizada a pesquisa por método directo em que se utiliza um método de cromatografia, onde são utilizadas as zaragatoas fornecidas no Kit para efectuar os exsudados faríngeos. As amostras devem ser processadas de imediato.

O teste kit permite a detecção qualitativa do antigénio de Estreptococos Beta-Hemolítico do grupo A, em amostras de exsudados faríngeos, através da combinação do conjugado monoclonal com um complexo corado e anticorpos policlonais em fase sólida. Assim o conjugado IgG anti-humano (corado) liga-se aos anticorpos IgG presentes no soro, formando um complexo anticorpo-antigénio que se irá ligar ao anticorpo anti-estreptococos do grupo A, na zona de reacção, formando uma linha de teste rosa (resultado positivo).

Também pode ser utilizado o método de cultura em gel de agarose enriquecido com sangue, onde se consegue distinguir a sua presença em cultura em gel de agarose pois o *Streptococcus pyogenes* tem como característica a beta-hemólise (hemólise completa).

2.6. Pesquisa de *Streptococcus* do grupo B

Trata-se de um teste que deve ser realizado pelas mulheres grávidas entre as 35 – 37 semanas de gestação. Este tipo de bactéria é especialmente grave no recém-nascido, podendo causar sépsis, pneumonia ou ainda meningite.

. O produto é colhido com zaragatoa própria e quando necessário em meio de transporte. Para este tipo de colheita não se deve utilizar espéculo e a amostra deve ser colhida no terço inferior da vagina. Caso seja pedido também a pesquisa na zona anal, colher com outra zaragatoa na zona rectal.

Inicialmente a zaragatoa é semeada em caldo de enriquecimento Todd-Hewit, deve ser homogeneizado e incubar a 37°C por 24H. Após este tempo é feita passagem para o meio Granada, onde se volta a incubar 24H em anaerobiose (as placas são colocadas em jarra de inox com uma vela acesa, quando a vela apagar é fechada a jarra e vai a incubar na estufa a 37°C). Se após 24H, não se visualizar a presença de colónias suspeitas, incubar por mais 24H.

Em alternativa ao meio Granada, pode ser utilizada Gelose de Sangue, incubando a 37°C em CO² por 24H.

2.7. Pesquisa de eosinófilos

Inicialmente devem ser realizadas lâminas para observação ao microscópio. Se há pedido de exsudado faríngeo é realizada uma lâmina e se há pedido de exsudado nasal fazer duas lâminas, uma para a narina direita e outra para a narina esquerda. Para as amostras de expectoração, os esfregaços devem ser finos e deve ser utilizada a zona mais purulenta da expectoração.

O produto proveniente do exsudado deve ser espalhado por toda a lâmina. Estas são coloradas pela coloração HEMACOLOR-MERCK.

A observação ao microscópio é feita com objectiva de emersão. Ao observar-se eosinófilos é calculada a sua percentagem em relação aos outros glóbulos presentes na lâmina.

2.8. Colorações

Coloração de Azul de Metileno

Após secagem das lâminas deve-se fixar à chama do bico de bunsen. Cobrir completamente com a solução aquosa de Azul-de-metileno. Deixar actuar cerca de 10 minutos, lavar com água corrente, secar na estufa e observar ao microscópio.

Coloração de Gram

Após secagem das lâminas deve-se fixar à chama do bico de bunsen. Cobrir completamente com a solução de Cristal Violeta durante 1:30 minutos. Lavar com água corrente durante 30 segundos. Cobrir completamente com solução de Lugol e deixar actuar 3 minutos. Lavar com água corrente 20 segundos. Cobrir com a solução descorante Álcool-acetona (7:3) 5 a 10 segundos. Lavar com água corrente 30 segundos. Cobrir com a solução de Safranina durante 1 minuto. Lavar com água corrente 1 minuto. Secar na estufa e observar ao microscópio.

Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

Após secagem das lâminas deve-se fixar à chama do bico de bunsen. Cobrir completamente com a solução 2 de Carbol-fucsina (Fucsina básica fucinada) durante 5 minutos. Lavar bem a lâmina com água corrente. Cobrir completamente com solução descorante Álcool-clorídrico (8:2). Lavar imediatamente com água corrente. Cobrir com solução Verde de Malaquite durante 10 minutos. Lavar com água corrente. Deixar secar ao ar e observar ao microscópio.

C. IMUNOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA

Nesta secção serão descritos os testes realizados para o estudo imunológico e endocrinológico do utente.

O sistema imunológico actua na defesa do organismo contra elementos externos como vírus, bactérias e agentes alérgicos.

A endocrinologia permite o estudo das hormonas do nosso organismo. Analisa doenças da tiróide, hipófise, pâncreas e glândulas supra-renais.

Podem ser utilizadas como amostras o soro e a urina.

1. Equipamentos

1.1. Cobas e411

O fundamento deste equipamento (figura 10) é baseado na tecnologia ECL – electroquimicoluminescência. Esta tecnologia permite com alta sensibilidade detectar a luminescência que amplifica o sinal desejado, reduzindo todos os outros e utiliza também a amplificação de sinal para detectar concentrações muito reduzidas do analito. Assim este aparelho concede-nos uma alta sensibilidade e assim não efectua repetições desnecessárias.



Figura 10 – Representação do equipamento Cobas e411. Adaptado de <http://realdiagnostics.com.br/siteatual/index.php/produtos-e-servicos/item/22-cobas-e411>

Para a análise de alguns parâmetros analíticos tem a capacidade de fazer a diluição automaticamente assim como analisar correctamente a amostra quando esta se encontra em reduzida quantidade.

As análises realizadas por este equipamento estão descritas na tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros analíticos obtidos pelo equipamento Cobas e411

Grupos de análise	Parâmetros a analíticos
Tiróide	TSH, T3, T4, FT3, FT4, Anti-Tg e Anti-TPO.
Hormonas de fertilidade	Cortisol, Estradiol, FSH, LH, Progesterona, Prolactina, Testosterona e β -HCG.
Hepatites	Anti-HBc, Anti-HBs, AgHBs e anti-HCV.
Grupo TORCH	Toxoplasma IgM e IgG, Rubéola IgM e IgG e CMV IgM e IgG.
Retrovírus	HIV I + II
Alergias	IgE
Défices hematológicos	Ferritina, Ácido fólico e Vitamina B12
Marcadores tumorais	CA 125, CA 15.3, CA 19.9, CEA, PSA total e livre e alfa-fetoproteína.

A análise dos parâmetros da tiróide pode auxiliar no diagnóstico de hipertiroidismo (Doença de Graves) ou hipotiroidismo (Tiróidite de Hashimoto).

O doseamento das hormonas de fertilidade podem auxiliar no diagnóstico de patologias associadas ao córtex adrenal. São utilizadas em análises de diagnóstico na situação de Síndrome de Cushing e também na Doença de Addison.

É realizado neste aparelho o doseamento do cortisol urinário. A maioria do cortisol circulante encontra-se ligada à globina e à albumina. A sua síntese e secreção são mantidas por um feedback negativo do eixo do córtex hipotálamo-hipófise-suprarrenal. O doseamento do cortisol urinário tem importância na análise do Síndrome de Cushing.

No diagnóstico do Vírus da Hepatite B (HBV), é analisado o antígeno de superfície (AgHBs) que é utilizado como primeiro marcador viral. O anti-HBc detecta os anticorpos específicos para HBV, sendo IgM que predomina na fase aguda da infecção. O anti-HBs é indicativo de imunização eficaz após vacinação. As conclusões relativamente aos resultados da análise de HBV estão demonstradas na tabela 13.

Tabela 13 – Conclusões analíticas após resultados de infecção pelo Vírus da Hepatite B

Exemplos de resultados analíticos			Conclusões analíticas
AgHBs –	Anti-HBc –	Anti-HBs –	• Susceptível de infecção.
AgHBs –	Anti-HBc –	Anti-HBs +	• Imunização eficaz pela vacinação.
AgHBs –	Anti-HBc +	Anti-HBs –	• Convalescência da infecção; • Infecção antiga; • Susceptibilidade ou falso positivo para anti-HBc; • Infecção crónica.
AgHBs –	Anti-HBc +	Anti-HBs +	• Imunização natural por infecção.
AgHBs +	Anti-HBc –		• Período de incubação
AgHBs +	Anti-HBc +	Anti-HBs – (após anti-HBc IgM –)	• Infecção crónica
AgHBs +	Anti-HBc +	Anti-HBs – (após anti-HBc IgM +)	• Infecção aguda

O Vírus da Hepatite C (HCV) é avaliado pelo anti-HCV que detecta os anticorpos específicos do vírus.

No CMV são analisados os anticorpos específicos para IgM e IgG. Tem carácter obrigatório na mulher grávida, como as restantes análises do grupo TORCH, de modo a prevenir a infecção e actuar atempadamente na situação de primo-infecção. As conclusões relativamente aos resultados da análise de CMV estão demonstradas na tabela 14.

Tabela 14 – Conclusões analíticas após resultados de infecção pelo Citomegalovírus

Exemplos de resultados analíticos		Conclusão analítica
IgM –	IgG +	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção antiga sem risco de primo-infecção.
IgM –	IgG –	<ul style="list-style-type: none"> • Sem infecção pelo CMV com risco de primo-infecção.
IgM +	IgG –	<ul style="list-style-type: none"> • Falso positivo para IgM; • Início de primo-infecção.
IgM +	IgG +	<ul style="list-style-type: none"> • Primo-infecção recente ou antiga; • Reactivação; • Falso positivo para IgM.

Para a rubéola são detectados os anticorpos específicos IgM e IgG.

A toxoplasmose resulta da infecção pelo parasita *Toxoplasma gondii*. Como nas análises do sistema TORCH já descritas, são avaliados os anticorpos IgM e IgG.

Em todos os parâmetros do grupo TORCH é avaliada a avidéz da IgG, que permite distinguir infecções antigas de infecções recentes.

Para o diagnóstico de HIV é utilizado um teste de 4ª geração que permite detectar os anticorpos para o HIV-1, incluindo o grupo O, os anticorpos para o HIV-2 e o Antígeno p24 do HIV-1.

A IgE avaliada é a IgE total que nos pode auxiliar nas situações de hipersensibilidade resultantes da produção excessiva da IgE.

Os valores obtidos pelos parâmetros analíticos dos défices hematológicos servem para avaliar o estado nutricional do utente.

Em relação aos marcadores tumorais, CA 125 está associado à avaliação do cancro do ovário, CA 15.3 é o marcador mais sensível e específico para o cancro da mama, CA 19.9 auxilia no seguimento e prognóstico do cancro colorectal, CEA é doseado como marcador de prognóstico do cancro da mama e colorectal, PSA total e livre são marcadores para o cancro da próstata e alfa-fetoproteína é utilizado como marcador biológico em mulheres grávidas para detectar anomalias cromossomais do feto.

1.2. Unicap (Phadia 100)

Este equipamento (Figura 11) permite realizar testes específicos de alergias e autoimunidade. O seu processamento de análise é automatizado pelos ensaios EliA e ImmunoCAP. Permite a detecção de 650 alergénios e 90 componentes alergénicos. Apenas uma amostra é suficiente para realizar mais que um tipo de ensaio, conferindo rentabilidade e ainda tem a funcionalidade de efectuar diluições automáticas.



Figura 11 – Representação do equipamento Unicap (Phadia 100). Adaptado de <http://www.phadia.com/en-GB/5/Phadia-Laboratory-Systems/Phadia-100/>

Este equipamento funciona com base no método de imunoensaio enzimático de fluorescência, em que há ligação dos anticorpos específicos que possam estar presentes na amostra do utente ao antigénio. Ao haver esta ligação a enzima transforma o substrato num produto fluorescente que vai ser quantificado de acordo com a sua concentração.

As análises realizadas por este equipamento estão descritas na tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros analíticos do equipamento Unicap

Grupos de análise	Parâmetros a analíticos
EliA Gliadina ^{DP} IgA	Determinação quantitativa de anticorpos gliadina IgA.
EliA Gliadina ^{DP} IgG	Determinação quantitativa de anticorpos gliadina IgG.
EliA Celikey IgA	Determinação quantitativa de anticorpos IgA da transglutaminase (tTG) anti-tecdular.
EliA Celikey IgG	Determinação quantitativa de anticorpos gliadina IgG.
EliA CTD Screen	Determinação qualitativa de anticorpos IgG; antinucleares e citoplasmáticos
EliA dsDNA	Determinação quantitativa de anticorpos IgG específicos do antigénio dsDNA.
ImmunoCAP Específico IgE	Determinação quantitativa da IgE específica contra alergénios.

EliA Gliadina^{DP} IgA e EliA Gliadina^{DP} IgG são utilizadas no apoio ao diagnóstico de doença celíaca. A doença celíaca tem natureza multifacetada com apresentação clínica variável, desde manifestações gastrointestinais, formas assintomáticas e extraintestinais. As gliadinas são polipéptidos de glúten solúveis em álcool e responsáveis por efeitos tóxicos na mucosa intestinal.

EliA Celikey IgA, é utilizada no apoio ao diagnóstico de doença celíaca, baseado no antigénio da transglutaminase recombinante do tecido humano. A transglutaminase tecidular é o principal auto-antigénio na doença celíaca. Os anticorpos IgA contra a tTG são marcadores específicos para a doença celíaca e também para a dermatite herpetiforme. Os anticorpos tTG IgG são menos específicos para estas patologias, mas são úteis como marcadores em utentes com deficiência em IgA.

EliA Celikey IgG, é utilizada no apoio ao diagnóstico de doença celíaca. Como os níveis de anticorpos de gliadina estão relacionados com a destruição da mucosa do tecido do intestino delgado, o diagnóstico sorológico não invasivo de doença celíaca é um forte candidato à substituição de biópsia, especialmente nas crianças.

EliA CTD Screen, é utilizada como meio auxiliar de diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), doenças mistas do tecido conjuntivo, síndrome de Sjögren, escleroderma e polimiosite/dermatomiosite.

EliA dsDNA, é utilizada como meio auxiliar ao diagnóstico de LES. Os anticorpos antinucleares (ANA) são bastante importantes no diagnóstico de doenças do tecido conjuntivo. No caso do LES, o dsDNA é um marcador altamente específico para o diagnóstico e também é utilizado na monitorização de LES, uma vez que o anti-dsDNA e a actividade da doença estão intimamente relacionados.

ImmunoCAP Específico IgE, é utilizado para o diagnóstico de doenças alérgicas, nomeadamente asma extrínseca, febre dos fenos ou eczema atópico. Estas doenças são desenvolvidas imediatamente após a exposição a alérgenos específicos.

1.3. VIDAS®

Este equipamento (Figura 12) tem por base um sistema automatizado de imunoensaio multiparamétrico com bancada. Utiliza a metodologia ELISA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Esta técnica é baseada na detecção de anticorpos específicos através da interacção antigénio-anticorpo.



Figura 12 – Representação do equipamento Vidas®. Adaptado de <http://www.biomerieux.com.br/produto/vidasr>

Apresenta mais de 100 parâmetros no formato de teste único com utilidade em testes de rotina, testes complementares, testes especializados ou testes de emergência. Os testes utilizados permitem determinar análises sorológicas, imunoquímicas, antigénios e imunohemostasia.

Neste aparelho utilizamos barretes simples e cones. As barretes são constituídas pelo conjugado, diluente, tampão de lavagem e a zona de amostra. Os cones são constituídos pelo antigénio ou anticorpo que se quer analisar. É no equipamento que se dá o processamento e análise da amostra, numa primeira fase ocorre a reacção imunológicas e numa segunda fase a reacção enzimática. O único processo manual é colocar a amostra no poço indicado.

As análises realizadas por este equipamento estão descritas na tabela 16.

Tabela 16 - Parâmetros analíticos do equipamento VIDAS®

Grupos de análise	Parâmetros a analíticos
Imunoquímicos	1. 25 OH Vitamin D Total
Doenças infecciosas	1. EBV VCA IgM; 2. EBV VCA/EA IgG; 3. EBV EBNA IgG;

A vitamina D total está associada à absorção do cálcio e o seu doseamento é importante e um auxiliar no diagnóstico de osteomalacia em adultos e raquitismo em crianças.

Neste equipamento a doença infecciosa analisada está relacionada com a mononucleose provocada pelo vírus do Epstein-Barr (EBV).

O EBV VCA IgM avalia o antígeno viral da cápside numa fase precoce da infecção desaparecendo após 4-6 semanas. Em caso positivo deve ser doseado IgG, que aparece na fase aguda da infecção com pico entre a 2ª e 4ª semana, estes anticorpos persistem ao longo do tempo em quantidade ligeira.

O EBV VCA/EA IgG avalia além do antígeno viral da cápside o antígeno precoce. Encontra-se na fase aguda da doença e deixa de ser detectada 3-6 meses após a infecção. A detecção destes anticorpos pode ser um sinal de infecção activa, apesar de uma pequena percentagem de pessoas saudáveis poder apresentar estes anticorpos durante alguns anos.

O EBV EBNA IgG avalia o antígeno nuclear. O antígeno não é detectado na fase aguda de infecção. A sua detecção ocorre 2-4 meses após os sintomas e persiste ao longo da vida.

2. Técnicas Manuais

2.1. Anticorpos Anti-treponema

É utilizado o Kit VISITECT® SYPHILIS. Este método é uma prova sorológica para a pesquisa da infecção pelo *Treponema pallidum*, causador de sífilis, uma vez que é um teste treponémico - pesquisa os anticorpos específicos para *Treponema pallidum*. Este tipo de teste ao utilizar o antigénio é confirmatório da reactividade apresentada pelos testes não treponémicos.

A sífilis é uma IST provocada pela bactéria *Treponema pallidum*, que pode ter períodos de actividade: sífilis primária; secundária e terciária; e períodos de latência: sífilis latente (6-8 semanas). Após a sífilis secundária, que normalmente ocorre nos primeiros 2 anos, os períodos de latência vão-se tornando mais longos.

A transmissão pode também ocorrer da mãe para o feto, sífilis congénita, que pode ser considerada precoce quando a doença se manifesta nos 2 primeiros anos de vida ou tardia, após esse período.

No caso do diagnóstico pode ser considerada recente quando é detectada até 1 ano após a infecção ou tardia, quando o diagnóstico é feito depois de 1 ano.

2.2. VDRL

É utilizado o método de aglutinação em placa, utilizado igualmente na pesquisa de sífilis, tratando-se neste caso de um teste cardiolipínico (não treponémico).

Os doentes infectados apresentam no soro "reaginas" (anticorpos) que quando se ligam ao antigénio cardiolipínico produzem uma flocculação visível.

Este tipo de teste não traduz a resolução da doença, pois o doente pode continuar a ter resultados reactivos apesar da evolução e tratamento serem favoráveis.

O Kit utilizado, IMMUNOTREP® RPR, é a forma modificada do clássico Antigénio VDRL. São utilizadas partículas de carvão, não havendo necessidade de se observar ao microscópico. Trata-se de um teste de diagnóstico presuntivo da sífilis.

Nos resultados fracamente positivos deve ser feita novo teste confirmatório. Os resultados falsos positivos estão associados a doentes que possuem outras infecções. Sempre que o doente apresentar um resultado positivo deve ser feito um teste específico para a confirmação do treponema.

Para as amostras testadas, este Kit apresentou 100% de exactidão, pois todas as amostras negativas apresentaram resultados negativos e todas as positivas resultados positivos.

2.3. Sorologia infecciosa

É utilizado o Kit Fortress Diagnostics. As diferentes reacções consistem num teste de aglutinação Anticorpo-Antigénio.

Todas as reacções seguidamente descritas apresentam o mesmo procedimento, apresentando apenas a especificidade do antigénio. São utilizados 40µl de soro do utente para uma gota de antigénio (título 1/40), agita-se durante um minuto e observa-se se há formação de aglutinação. Na ausência de aglutinação, procede-se à utilização de 80µl de soro para uma gota de antigénio (título 1/20), sendo o restante procedimento semelhante ao descrito anteriormente. Caso ocorra aglutinação devem ser feitas mais diluições com 20 µl, 10 µl e 5µl de soro para uma gota de antigénio, realizando o restante procedimento descrito, sendo dado o valor do título que corresponde à diluição do último círculo onde se observa a aglutinação, respectivamente, título 1/80, 1/160 e 1/320.

Reacção de Widal

Os antigénios utilizados são: Typho O; Typho H; Paratypho A-H e Paratypho B-H.

Reacção de Weil-Felix

Os antigénios utilizados são: Proteus OX2; OX19 e OXK

Reacção de Huddlesson

O antigénio utilizado é: Brucella abortus.

2.4. Reacção de Wright

Para preparar a reacção são utilizados 8 tubos. No primeiro tubo são utilizados 1,9 ml de soro fisiológico e nos restantes tubos 1 ml. No primeiro tubo são utilizados 100 µl de soro. Deve-se agitar bem e transferir 1 ml do preparado para o segundo tubo. Realizar o mesmo procedimento nos tubos seguintes. No oitavo tubo é rejeitada a solução, sendo este composto apenas por soro fisiológico (utilizado como solução controlo).

Deve ser agitado o reagente de *Brucella* e adicionar a cada tubo 1 gota. Agitar os tubos e incubar a 37°C durante 24H.

O valor do título corresponde ao tubo que apresenta aglutinação. O tubo de controlo deve estar ausente de aglutinação. Os títulos correspondem respectivamente a 1/20; 1/40; 1/80; 1/160; 1/320; 1/640 e 1/1280.

Esta reacção permite a pesquisa de *Brucella*.

2.5. Crioaglutininas

Os tubos de colheita devem ser previamente aquecidos. Colher 10 ml de sangue venoso e deixar retraindo o coágulo a 37°C. Centrifugar e separar à temperatura ambiente 5 ml de soro para tubos transparentes de fundo cónico.

Refrigerar entre 2-8°C e observar até 7 dias se ocorre a formação de precipitado.

Se não há formação de precipitado o resultado é negativo.

Se há formação de precipitação, o resultado é positivo caso seja pedida a pesquisa de crioaglutininas.

Se o pedido é de caracterização de crioaglutininas, deve retirar-se o máximo do sobrenadante, transferir o precipitado para um tubo eppendorf e adicionar 100 µl de soro fisiológico. Esta amostra é enviada para o Laboratório Dr. Joaquim Chaves para a caracterização.

D. BIOQUÍMICA – QUÍMICA CLÍNICA

Através da química clínica podemos analisar a bioquímica do sangue, a imunologia e os electrólitos. É pela sua análise que podemos auxiliar patologias que envolvam a função renal, hepática, as dislipidémias e disproteinémias, a diabetes, os distúrbios do ferro e das proteínas plasmáticas.

Assim através desta secção podemos avaliar e monitorizar as alterações bioquímicas dos metabolismos, dos órgãos e dos sistemas.

Podem ser utilizadas como amostras soro e urina.

1. Equipamentos

1.1. Clinitek Atlas

É um equipamento automatizado para a análise de urina tipo II (Figura 13). Apresenta no seu interior tiras de análise de urina de onde é avaliada a amostra. É utilizado o método de fotometria de reflectância para medir a alteração de cor e é utilizado o índice de refração para determinar a gravidade específica.



Apenas são necessários 2 ml de urina para que haja uma eficaz análise. É utilizado um controlo positivo e um controlo negativo de 14 em 14 dias ou sempre que o aparelho é calibrado.

Figura 13 – Representação do equipamento Clinitek Atlas. Adaptado de <https://www.healthcare.siemens.pt/urinalysis/systems/clinitek-atlas-urine-chem-analyzer>

As análises realizadas por este equipamento estão descritas na tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros analíticos obtidos pelo equipamento Clinitek Atlas

Resultados obtidos pelo aparelho	Tipo de exame
Gravidade específica	Exame físico
Cor	
pH	Exame químico
Proteínas	
Glucose	
Corpos cetónicos	
Sangue	
Bilirrubina	
Urobilinogénio	
Nitritos	
Leucócitos	

No exame físico além dos parâmetros analisado pelo aparelho devem ser avaliados o volume de urina, o aspecto e o cheiro. As alterações de volume são classificadas em oligúria, anúria e poliúria. A oligúria corresponde à excreção diminuída de urina (< 400 ml/dia no adulto) e pode evoluir para anúria quando há interrupção do fluxo urinário resultante de lesão

renal por obstrução. A poliúria corresponde ao aumento do volume de urina excretado (> 2500 ml/dia no adulto) e está associada a situação de diabetes *Insiptidus* ou diabetes *Mellitus*.

No aspecto é avaliada a turvação da urina que pode ter origem não patológica ou patológica devido a células epiteliais em descamação ou devido à presença de muco. Aspectos patológicos a ter em conta são a presença de leucócitos, glóbulos vermelhos, bactérias, fungos e cristais anormais. O cheiro é alterado quando estão presentes acetonas (situação de diabetes), amónia e bactérias.

A cor pode variar desde quase incolor até preto. A gravidade específica mede as substâncias químicas dissolvidas na urina que depende do poder de extracção e concentração renal. Os valores normais encontram-se entre 1,015-1,025.

São valores normais de pH 5,5 – 6,0. O aumento de proteínas na urina é indicativo de lesão renal. A glucose e corpos cetónicos são normalmente encontradas em amostras de utentes diabéticos descompensados. A presença de sangue pode ser indicativa de hemorragias, cálculos renais, tumores ou traumas. Valores aumentados de urobilinogénio são indicativos de doença hepática e hemolítica. Não é normal a presença de bilirrubina na urina.

No exame microscópio do sedimento urinário são quantificadas as células epiteliais, os eritrócitos, os leucócitos, a presença de cilindros urinários, a presença de cristais e o estado do sedimento.

É normal a presença de células epiteliais, desde que não seja em abundância. O valor normal de eritrócitos no sedimento urinário é de 0-2 por campo. Os leucócitos apresentam valores normais para o homem de 0-3 por campo, nas mulheres e crianças o valor é de 3-5 por campo. Os cilindros urinários são provocados pelo aumento da concentração de proteínas ou sais e pela diminuição do pH. Os cristais de ácido úrico e de oxalato de cálcio são normais na urina, mas a presença de apenas um cristal de cistina ou colesterol é considerada anormal. O sedimento anormal é considerado amorfo e pode ser devido a urinas ácidas que são amareladas ou rosadas e apresentam uratos ou devido a urinas alcalinas que são esbranquiçadas e apresentam fosfatos.

1.2. Cobas Integra Plus 400

Este equipamento (Figura 14) integra quatro princípios diferentes consoante os tipos de analitos. Neste laboratório apenas são utilizados três.

A fotometria de absorvância é utilizada para a análise de enzimas e os substratos. É baseada na absorção específica de radiação electromagnética de um determinado composto que pela fotometria permite identificar e calcular a concentração deste.

A turbidimetria é utilizada na avaliação de proteínas específicas. O princípio baseia-se na medição da luz não dispersa que incide na amostra podendo medir a absorvância, determinando a concentração da amostra.

A potenciometria por eléctrodo selectivo de iões é utilizada para realizar o ionograma assim como a análise específica e isolada de iões. Tem como principio o uso de eléctrodos selectivos que medem as diferenças de potencial, em que o potencial do eléctrodo ocorre pela migração selectiva de espécies iónicas através de membranas.

As análises realizadas por este equipamento estão descritas na tabela 18.



Figura 14 – Representação do equipamento Cobas Integra Plus 400. Adaptado de <http://www.cobas.com/home/product/clinical-and-immunochemistry-testing/cobas-integra-400-plus.html>

Tabela 18 - Parâmetros analíticos obtidos pelo equipamento Cobas Integra Plus 400

Método analítico	Parâmetros a analisar
Fotometria de absorvância	Bilirrubina directa e total; cálcio; colesterol total; LDL colesterol; HDL colesterol; creatinina; glucose; ferro; magnésio; fósforo; proteínas totais; triglicéridos; ureia; ácido úrico; transaminases (AST e ALT); amílase; lípase; CK; CK-MB; LDH e γ GT.
Turbidimetria	Albumina; TASO; C3; C4; ferritina; Imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM); transferrina; PCR e hr-PCR e factor reumatóide.
Potenciometria por eléctrodo selectivo de iões	Ionograma; cloretos; lítio; potássio e sódio.

Os compostos azotados não proteicos – ureia, creatinina e ácido úrico, são os parâmetros doseados para auxiliar na avaliação da função renal. Além destes são avaliados em amostras de urina a microalbuminúria, creatinina na urina e proteínas urinárias. As patologias associadas a alterações da função renal são a Glomerulonefrite aguda e crónica, o Síndrome nefrótico e nefrítico e a falência renal aguda e crónica.

A bilirrubina, transaminases, fosfatase alcalina, γ GT, CEA e α -fetoproteína permitem fazer uma avaliação da função hepática. As patologias associadas a alterações da função hepática são principalmente as Hepatites A, B e C, a Hepatite alcoólica e a cirrose.

A função cardiovascular é avaliada pelo doseamento de CK e CK-MB, pela razão colesterol HDL/Colesterol LDL (factor de risco para o desenvolvimento de Doença Cardiovascular). Além destes parâmetros podem ser avaliadas as troponinas, miosina e os dímeros.

A avaliação do equilíbrio ácido-base e electrolítico tem por base o ionograma.

O doseamento do factor reumatóide (RA) permite auxiliar no diagnóstico de artrite reumatóide.

1.3. Hydrasys

1.3.1. Electroforese de proteínas

Relativamente à electroforese de proteínas, utiliza-se o gel HYDRAGEL PROTEIN(E), onde o soro é separado nas fracções Albumina, Alfa-1; Alfa-2; Beta e Gamma (Figura 15). O princípio baseia na electroforese em gel de agarose, onde há separação de moléculas com a migração segundo uma aplicação de diferença de potencial. Esta diferença de potencial promove a migração segundo o tamanho molecular, com as partículas com menor massa a migrarem mais rapidamente.

Este equipamento é semi-automático, requerendo a manipulação na colocação do gel no aparelho e aplicação da amostra. Os resultados podem ser visualizados directamente a partir do gel no fim de seco e podemos ainda realizar um scan do gel e avaliá-lo a partir do sistema informático.

Deve-se ter em atenção que amostras congeladas podem levar ao aparecimento de uma banda ligeira no ponto de aplicação devido à desnaturação de proteínas ou devido às lipoproteínas. Não devem ser utilizadas amostras de plasma uma vez que a migração de fibrinogénio pode ser confundida com uma gamapatia monoclonal.

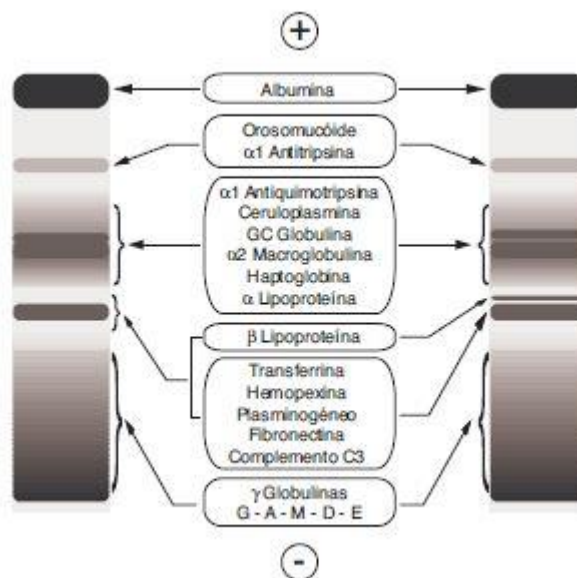


Figura 15 – Representação do perfil electroforético de proteínas. *Adaptado de Giot, J.-F. (2010).*

Para a análise da electroforese de proteínas podem ser utilizados géis de 7 ou 15 poços. Normalmente no nosso laboratório fazíamos sempre algumas amostras em duplicado, para não desperdiçar tempo e testes.

Quanto ao procedimento deve ser colocado o aplicador numa superfície plana com o número dos poços voltados para cima, são aplicador 10 μ l de soro ou urina em cada poço (este procedimento não deve ser superior a dois minutos). O aplicador deve ser colocado em câmara húmida com os dentes voltados para cima durante cinco minutos para que haja difusão da amostra. O gel deve ser colocado virado para cima no aparelho após aplicar 120 μ l de água destilada na placa de migração. O aplicador deve ser colocado na posição seis com os números voltados para o operador. Seguidamente deve-se fechar a tampa da câmara e iniciar a migração. No final da migração deve-se colocar o gel no suporte da câmara de coloração, seleccionando o programa para que esta se inicie. Neste caso é utilizado como corante o Negro de Amido. Após a fase da coloração é feita a leitura do gel através do scanner.

Na electroforese de proteínas são avaliadas 4 fracções de proteínas, a Albumina, a α 1-Globina, a α 2-Globina, a β -globina e a γ -Globina. As situações patológicas associadas às diferentes fracções de proteínas estão representadas na tabela 19.

Tabela 19 - Situações patológicas associadas às diferentes fracções de proteínas

Fracções de proteínas	Situações patológicas associadas
Albumina	<ul style="list-style-type: none"> • Alterações do metabolismo proteico; Hipoalbuminémia e Hiperalbuminémia.
<p>α1-Globina</p> <ul style="list-style-type: none"> → α1-antitripsina; → α1-glicoproteína ácida; → α-fetoproteína 	<ul style="list-style-type: none"> • Situações inflamatórias; Doença hepática; Efeitos hormonais e Carcinomas.
<p>α2-Globina</p> <ul style="list-style-type: none"> → Haptoglobina; → α2-macroglobulina; → Ceruplasmina 	<ul style="list-style-type: none"> • Situações inflamatórias e infecciosas; Problemas hormonais; Doença hepática; Carcinoma da próstata e Doença de Wilson.
<p>β-globina</p> <ul style="list-style-type: none"> → Transferrina; → β1-lipoproteína; → Complemento C3; → Complemento C4; → β2-microglobulina; → Proteína C reactiva. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia ferropénica, hemocromatose ou hemossiderose; Hipercolesterolémia; Obstrução biliar; Doenças auto-imunes e Doenças genéticas.
<p>γ-Globina</p> <ul style="list-style-type: none"> → Imunoglobulinas <ul style="list-style-type: none"> ○ 70-75% IgG; ○ 10-15% IgA; ○ 5-10% IgM e IgD; ○ < 1% IgE. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hipogamaglobulinémia <ul style="list-style-type: none"> ○ Genética ou fisiológica; ○ Secundária a doenças hematológicas malignas, a medicamentos e à perda anormal de proteínas. • Hipergamaglobulinémia <ul style="list-style-type: none"> ○ > IgG nas infecções crónicas, doenças auto-imunes e hepatocelulares; ○ > IgM nas infecções virais e cirrose biliar primária; ○ > IgG e IgA na cirrose portal. • Paraproteínas – proteínas monoclonais <ul style="list-style-type: none"> ○ Mieloma múltiplo.

1.3.2. Imunoelectroforese

A Imunoelectroforese é baseada também no princípio da electroforese em gel de agarose, mas seguida de imunofixação (Figura 16).

Pode ser realizada quando há pedido específico ou em caso da electroforese de proteínas apresentar alterações monoclonais. Neste caso é feito um gel por amostra. As imunoglobulinas monoclonais são marcadores de gamopatias e são detectadas pela electroforese de proteínas. Na imunoelectroforese, através do processo de imunofixação e com antisoros monoespecíficos é realizada a identificação das bandas monoclonais.

Permite auxiliar na distinção entre gamopatias mono e policlonais e nomeadamente no diagnóstico de mieloma múltiplo.

Aqui são analisadas as cadeias leves – Kappa e Lambda e pesadas -Gamma das imunoglobulinas. Como apresentado na figura, G (Gamma) corresponde a IgG; A (Alfa) corresponde a IgA, M (Mu) corresponde a IgM, K (Kappa) corresponde à cadeia Kappa e L (Lambda) corresponde à cadeia Lambda.

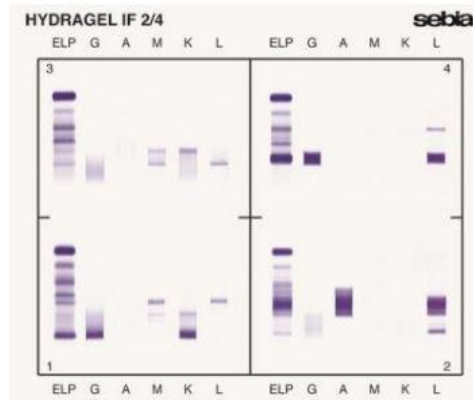


Figura 16 – Representação do gel de imunoelectroforese. Adaptado de <http://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-if>

O procedimento inicia-se com a preparação da amostra. Coloca-se 200 µl de soro + 100 µl de diluente na pista imunológica G, na pista de referência ELP e restantes pistas imunológicas coloca-se 30 µl de soro + 60 µl de diluente. O aplicador deve ser disposto numa superfície plana com o número de poços voltado para cima aplicando 10 µl de soro (este procedimento não deve ser superior a dois minutos). O gel deve ser colocado virado para cima no aparelho após aplicar 120 µl de água destilada na placa de migração. O aplicador deve ser

colocado na posição seis com os números voltados para o operador. Fechar a tampa da câmara e iniciar a migração.

Para a preparação do processo de imunofixação deve-se colocar a máscara dinâmica numa superfície plana com o segmento de anti-soros coloridos no suporte. São distribuídos 8 µl de anti-soros por poço. O modo de distribuição é: ELP (fixador), cor amarela; G (anti-soro anti-cadeias pesadas Gamma), cor rosa; A (anti-soro anti-cadeias pesadas Alfa), cor azul-escuro; M (anti-soro anti-cadeias pesadas Mu), cor verde amarelada; K (anti-soro anti-cadeias leves livres e ligadas Kappa), cor verde-claro e L (anti-soro anti-cadeias leves livres e ligadas Lambda), cor azul claro.

Abrir a tampa da câmara de migração, retirar o aplicador e colocar em posição com o gel a máscara dinâmica. Pressionar no ponto central de modo a que o segmento de anti-soro contacte com a superfície do gel, empurrar lentamente o suporte com movimento regular de ida e volta por toda a extensão do gel de modo a aplicar eficazmente os reagentes (este procedimento não deve ser superior a cinco segundos). Remover a máscara dinâmica e iniciar a migração. No final da migração deve-se colocar o gel no suporte da câmara de coloração, seleccionando o programa para que esta se inicie. Neste caso é utilizado como corante o Violeta Ácido. Após a fase da coloração é feita a leitura do gel através do scanner.

É realizado controlo com um soro normal sempre que realizada a técnica. Mensalmente é realizado controlo com um soro patológico.

2. Técnicas Manuais

2.1. Pesquisa de drogas de abuso

É utilizada a metodologia de imunocromatografia POCT, utilizando o Kit One Step Screen Test Device da SPINREACT. Neste caso o resultado é negativo quando aparece linha colorida na zona de controlo (C) e na zona de teste (T).

O utente deve preencher a declaração da “Cadeia de custódia”. A colheita da 1ª urina da manhã deve ser efectuada na presença de um técnico para 2 recipientes próprios, os quais devem ser selados e etiquetados na presença do utente. Uma das amostras é utilizada para efectuar a análise e a outra é congelada durante 3 meses, caso seja necessário efectuar contra-prova.

Cadeia de Custódia: é utilizada neste caso, uma vez que o produto a analisar pode ser possível de constituir prova em processo judicial. É este documento que garante a rastreabilidade de todo o procedimento desde a colheita da amostra, manuseamento, análise e sua confirmação. Este modelo é preenchido pelo utente e pela técnica responsável pela recolha da amostra.

2.2. Pesquisa de sangue oculto

É utilizada a metodologia de imunocromatografia utilizando o Kit FOBplus da bioNexia.

Este tipo de teste rápido é realizado em alternativa à colonoscopia para rastreio ou acompanhamento em pacientes de baixo risco.

O teste kit permite a detecção qualitativa de hemoglobina humana nas fezes, baseando-se no método imunocromatográfico onde apenas é reconhecida a hemoglobina humana pela reacção com anticorpos específicos (anticorpo monoclonal específico marcado com ouro). Assim a hemoglobina presente nas fezes vai reagir com o complexo de anticorpos, que ao chegar à zona de teste (por migração capilar), vai contactar com os anticorpos anti-hemoglobina, formando uma linha de teste vermelha (resultado positivo).

A especificidade do teste-kit para doentes com colonoscopia negativa é de 81,9% e sensibilidade para a detecção de todos os adenomas é de 35,8%. Quanto à sensibilidade

analítica, obtém-se resultado positivo nas amostras em que a concentração de hemoglobina humana é ≥ 40 ng de tampão de hemoglobina/ml após a extracção.

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é um exame de rastreio que deve ser realizado todos os anos por pessoas com idade superior a 50 anos, pois é nesta idade que há um risco aumentado de desenvolver cancro do cólon. Um resultado positivo não é indicativo de cancro do cólon, uma vez que este teste de rastreio apenas identifica a presença de sangue, assim sendo deve ser realizada uma colonoscopia a fim de averiguar se há presença de pólipos ou massa tumoral maligna ou qual a origem do sangramento (ao encargo do médico especialista).

2.3. Teste de gravidez

É utilizada a metodologia de imunocromatografia em que o teste kit é um imunoenensaio cromatográfico para a detecção quantitativa de Gonadotrofina Coriónica humana na urina ou soro.

Este teste consiste na detecção selectiva de níveis elevados de hCG através da combinação de anticorpos onde está incluído um anticorpo monoclonal hCG. Além deste tipo de teste deve ser sempre feito o diagnóstico de gravidez confirmatório, caso o resultado seja positivo.

A hormona hCG é composta por 2 sub-unidades, alfa e beta, ligadas não covalentemente por interacções hidrofóbicas e iónicas. É a variante hCG hiperglicosilada que maioritariamente é produzida no início da gravidez, uma vez que promove a implantação do embrião e o desenvolvimento fetal durante a gravidez.

2.4. Magnésio eritrocitário

A maior parte do magnésio presente no organismo é intracelular, sendo que a quantidade de magnésio que é absorvida no intestino é inversamente proporcional à quantidade ingerida. São os rins que controlam a homeostase do magnésio, excretando-o quando está em excesso e em caso de défice há reabsorção tubular, conservando-o.

Para a realização do magnésio eritrocitário é necessário realizar uma preparação prévia (hemólise e desproteinização), sendo o doseamento feito no sobrenadante, no aparelho de bioquímica.

2.5. Waller Rose

É utilizado o kit SPINREACT. O método consiste na hemaglutinação em placa para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de FR (factor reumatóide).

O teste funciona como auxiliar ao diagnóstico de RA (artrite reumatóide).

O factor reumatóide é composto por auto-anticorpos que correspondem a imunoglobulinas dirigidas para a região Fc das IgG.

2.6. Grau de digestão das fezes

No exame macroscópico deve ser observada a forma, consistência, cor (externa e interna) e a presença de muco, sangue, pús, parasitas, restos de alimentos, medicamentos e matéria gorda.

Para o exame microscópico deve ser preparada uma suspensão de fezes, misturando-as com soro fisiológico (exceção: fezes líquidas).

Após preparada a suspensão, deve ser colocada uma gota em 3 lâminas limpas. Na primeira lâmina apenas deve ser colocada lamela sem nenhum reagente. Na segunda lâmina adicionar uma gota de Lugol concentrado e colocar a lamela. Na terceira lâmina adicionar uma gota de uma solução de Sudan III. Ao utilizar o Lugol, o amido cru vai corar de azul-violeta escuro, o amido cozido cora de avermelhado e a flora iodófila cora de azul. Ao utilizar a solução de Sudan III, as gorduras neutras vão corar de vermelho alaranjado e os sabões e ácidos gordos vão corar de rosa até negro.

Podemos observar pelas lâminas os elementos de origem intestinal e os resíduos alimentares. São elementos de origem intestinal o muco, os GV, os GB e os cristais (fosfato de amoníaco magnésiano, Charcot-Leyden). Nos resíduos alimentares podemos encontrar:

- Proteínas: devemos encontrar uma pequena quantidade de fibras musculares bem digeridas e não devemos encontrar tecido conjuntivo, como fibras musculares não digeridas);
- Gorduras: devemos encontrar uma pequena quantidade de glóbulos de gordura neutra, agulhas de ácidos gordos ou sabões);
- Hidratos de carbono: não devemos encontrar amido cozido. A celulose digerível aparece em pequena quantidade e a não digerível depende do tipo de alimentação;
- Cristais: oxalato de cálcio.

Para a determinação do pH das fezes utilizamos uma tira de papel indicador de pH. O pH normal das fezes varia entre 6,8 e 7,4. $\text{pH} \leq 4$ são indicativos de distúrbios na digestão de hidratos de carbono e $\text{pH} \geq 7,4$ são indicativos de distúrbios na digestão de proteínas.

2.7. Capacidade Total de Fixação de Ferro (CTFF)

Este valor pode ser obtido pela através da saturação da transferrina pela técnica descrita na bula TIBC additif, seguida da determinação do ferro no sobrenadante obtido.

O valor obtido é multiplicado pelo factor 3, ou pode ser feita a determinação da transferrina pela fórmula: $TIBC = TRF \times 1,43$.

2.8. Índice de Saturação de Ferro

Este índice é determinado pela fórmula $\frac{\text{Ferro sérico}}{CTFF} \times 100$. Em que CTFF é a capacidade total de fixação de ferro. O valor é sempre expresso em percentagem.

CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O controlo de qualidade interno tem como objectivo o controlo dos parâmetros analisados de modo a detectar anomalias e avaliar erros. Permite a correcção imediata o que assegura a qualidade dos nossos resultados na fase analítica.

As amostras controlo têm valores bem definidos e conhecidos, permitindo avaliar a exactidão e a precisão dos ensaios realizados ao comparar os valores obtidos com os valores expectáveis.

No início do dia de trabalho são obtidos todos os valores de controlo para os diferentes aparelhos e amostras a analisar. Estes dados são avaliados em gráficos Levey-Jennings que representam a dispersão dos dados em torno do valor alvo definido e do seu desvio padrão. Os valores da média e do desvio padrão podem ser os descritos na bula ou podem ser calculados pelo laboratório.

Se os valores obtidos ultrapassam os limites superiores e inferiores de controlo o nosso método analítico apresenta erros.

O erro total (ET) permite quantitativamente avaliar a incerteza do método, através dos erros aleatórios e dos erros sistemáticos. É representado pela fórmula: $ET = |BIAS| + z + CV$. O valor z pode ser 1,65 para um intervalo de confiança de 90% ou 1,96 para um intervalo de confiança de 95%.

O erro total admissível (ETa) é um intervalo estipulado pelo laboratório que tem como base as referências nacionais e internacionais. Permite caracterizar uma margem de erro admissível para os diferentes métodos, considerando a utilidade clínica dos resultados.

A métrica 6Sgima (σ), avalia o Eta, o BIAS e o coeficiente de variação (CV). É expressa pela fórmula: $\sigma = \frac{ETa - |BIAS|}{CV}$.

Os erros que podem ocorrer são do tipo aleatório ou sistemático. Os erros aleatórios acontecem quando os valores das amostras padrão se encontram dispersos em torno do valor médio. Os erros sistemáticos ocorrem quando há um desvio dos valores das amostras padrão se desviam do valor médio.

Ao serem detectados erros sistemáticos, ou seja, problemas na exactidão do nosso método, deve-se verificar: a concentração atribuída aos calibradores; a deterioração de

reagentes ou calibradores; se os reagentes foram mal preparados (diluições, hidratação...); se estão a ocorrer erros sistemáticos de pipetagem; se ocorreu modificação das temperaturas de incubação e ainda se houve nesse período mudança do operador.

Relativamente aos erros aleatórios – precisão do nosso método, estes também devem ser sempre verificados aquando a sua ocorrência. Assim deve ser verificada a repetibilidade da pipetagem e de detecção; a homogeneização dos reagentes; se o sistema apresenta bolhas de ar; se a temperatura do sistema é instável ou ainda se a corrente eléctrica é instável.

Ao serem analisadas as causas de erro, sejam eles sistemáticos ou aleatórios, e chegando à conclusão da sua causa, deve-se proceder de modo a minimizar os erros, para que estes não voltem a interferir nos nossos resultados analíticos.

Para interpretar os gráficos de Levey-Jennings são utilizadas as Regras de Westgard. Podem ser utilizadas 6 Regras de Westgard, descritas de seguida.

1. **Regra 1:2S:** quando o valor da amostra controlo ultrapassa o intervalo da média em ± 2 desvios padrão.
2. **Regra 1:3S:** quando o valor da amostra controlo ultrapassa o intervalo da média em ± 3 desvios padrão.
3. **Regra 2:2S:** quando o valor de 2 amostras de controlo ultrapassa o intervalo da média em ± 2 desvios padrão, do mesmo lado da média.
4. **Regra R:4S:** quando a diferença entre os valores de 2 amostras de controlo consecutivas é 4 vezes superior ao valor do desvio padrão.
5. **Regra 4:1S:** quando o valor de 4 amostras de controlo ultrapassa o intervalo da média em ± 1 desvios padrão.
6. **Regra 10: \bar{X} :** quando o valor de 10 amostras de controlo consecutivas se encontra do mesmo lado da média.

A. CQI HEMATOLOGIA

- a. No equipamento Advia 2120i e Vesmatic 30 Plus, os limites fornecidos são $\pm 2DP$. É utilizada a regra única **R1:2S**. Esta é uma regra de aviso e indicativa de erro aleatório.
- b. No equipamento Hi-Auto A1c (HA 8160), os valores da média e desvio padrão são determinados pelo laboratório. É utilizada a regra única **R1:2S**.

- c. No equipamento Sysmex CA 500, os valores dos limites são dados pelo fornecedor.

B. CQI IMUNOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA

- a. No equipamento Vidas, para os parâmetros que têm valores quantificáveis para o CQI é aplicado os limites $\pm 2DP$. Neste equipamento é necessário determinar os limites, pois os limites fornecidos são de 3DP. Deve ser realizada na configuração do equipamento os valores para QC1.
- b. No equipamento Cobas e411, são utilizados os limites dados pelo fornecedor, mas o equipamento é programado para apresentar as cartas controlo com apenas 1DP, apertando o limite de aceitação. São utilizadas as regras: **R1:2S** indicativa de erro aleatório, **R1:3S** indicativa de erro aleatório ou sistemático grave (o valor deve ser rejeitado e repetido), **R2:2S**, indicativa de erro sistemático (o valor da amostra de controlo deve ser rejeitado e repetido o processo) e **Regra 10: \bar{X}** , indicativa de erro sistemático (rejeição do valor da amostra de controlo).

C. CQI BIOQUÍMICA – QUÍMICA CLÍNICA E MONITORIZAÇÃO DE METABOLISMOS, ORGÃOS E SISTEMAS

- a. No equipamento Cobas Integra Plus 400, as técnicas colorimétricas são avaliadas por $\frac{1}{2}$ do DP dado pelo fornecedor e as técnicas de imunoturbidimetria apresentam o valor real dado pelo fornecedor. São utilizadas as regras: **R1:2S** indicativa de erro aleatório, **R1:3S** indicativa de erro aleatório ou sistemático grave (o valor deve ser rejeitado e repetido), **R2:2S**, indicativa de erro sistemático (o valor da amostra de controlo deve ser rejeitado e repetido o processo) e **Regra 10: \bar{X}** , indicativa de erro sistemático (rejeição do valor da amostra de controlo).

AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A avaliação externa da qualidade permite avaliar o desempenho do nosso laboratório comparando-o com outros com o objectivo de assegurar comparabilidade entre os resultados obtidos pelos diferentes laboratórios.

Este tipo de avaliação garante a reprodutibilidade dos resultados, verificação da calibração dos sistemas analíticos e a ocorrência de não conformidades (aplicação de acções correctivas).

Os resultados da AEQ permitem avaliar os métodos realizados pelo laboratório ao utilizar a métrica 6σ e o cálculo do erro total. Este processo permite aumentar a eficácia do laboratório pela optimização dos processos para que a satisfação seja garantida.

O Biolabor encontra-se inscrito nos seguintes programas de AEQ: INSA e RIQAS.

1. INSA

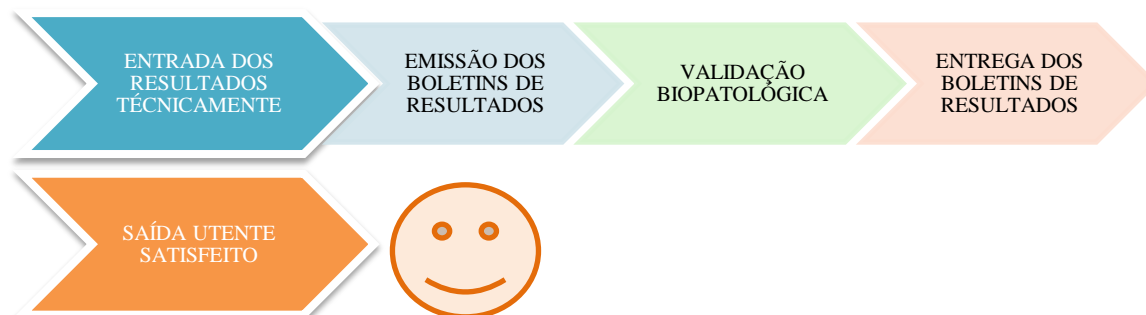
- a. Na valência de hematologia, são avaliados o Grupo Sanguíneo e o Factor Rh; Hemoglobina Glicada e Hemoglobinopatias através do aparelho Hi Auto-A1c;
- b. Na valência de microbiologia, são avaliadas 2 amostras para a bacteriologia e são realizados por mês um ensaio de: coprocultura; *Salmonella* ou *Neisseria gonorrhoeae* ou urocultura ou micologia ou *Streptococcus* do grupo B ou do grupo A.
- c. Na valência de imunologia, são avaliados através do aparelho Cobas e411 o anticorpo HBS; AAT (anti-TPO e anti-TG); CMV; IgE (avaliando a IgE total); anticorpos da rubéola (IgM e IgG) e da toxoplasmose (IgM e IgG). Quanto às técnicas manuais é realizado o ensaio de sífilis para avaliar a técnica de VDRL, os anticorpos anti-treponema e o ensaio de Brucella para avaliar as técnicas de Febris, Monoteste e Waller Rose. No aparelho Hydrasys é realizado um ensaio para a electroforese de proteínas e um ensaio para a imunoelectroforese.
- d. Na valência de bioquímica, são avaliados análise físico-química da urina tipo II, através do aparelho Clinitek Atlas. No aparelho Intrega 400 Plus são avaliados a albumina, C3 e C4, PCR, RA-teste, TASO e transferrina; os parâmetros urinários, como a microalbuminúria e a creatinina na urina. Quanto às técnicas manuais é feito 1 ensaio de Drogas de abuso; 1 ensaio de Sangue oculto e 2 ensaios de Teste de Gravidez.

2. RIQAS (mensal)

- a. Na valência de hematologia, no aparelho Advia 2120i com módulo de veterinária são analisados por contagem automática os seguintes parâmetros: HB; HT; MCH; MCHC; MCV; PLT; RBC; WBC e reticulócitos. No aparelho Sysmex são analisados o fibrinogénio; APTT em segundos e a razão; PT/INR e PT em segundos e a razão.
- b. Na valência de imunologia, no aparelho Cobas e411, são analisados os seguintes parâmetros: ácido fólico; alfa-fetoproteína; β -HCG, vitamina B12; parâmetros tumorais, nomeadamente CA125, CA 15.3, CA19.9 e CEA; grupo das hepatites com AgHBS, anticorpo HBC, HCV e o retrovírus, HIV.
- c. Na valência de bioquímica, no aparelho Cobas Integra Plus 400, são analisados os seguintes parâmetros: ácido úrico; transaminases (AST e ALT); alfa-amilase; bilirrubina total e directa; cálcio; colesterol HDL e total; creatinina; creatinina fosfo-quinase (CPK); ferro; fosfatase alcalina; gamaglutamiltranspeptidase (γ GT); glucose; ionograma; lípase; lítio; magnésio; proteínas totais; triglicéridos e ureia.

FASE PÓS-ANALÍTICA

Esta fase que engloba os processos desde a validação biopatológica até à entrega do boletim de resultados ao utente.



1. Emissão dos boletins de resultados

Após a introdução dos resultados no sistema informático, é impresso o boletim para a validação patológica.

A introdução dos resultados pode ser realizada de duas formas. De forma manual, em que os resultados são inseridos no sistema informático pelo operador ou de forma on-line, em que os resultados passam automaticamente dos equipamentos ligados em rede para o sistema informático.

O boletim de resultados é um documento escrito validado pelo especialista que contém os resultados quantitativos e qualitativos dos exames efectuados. Sempre que necessário é também acompanhado de comentários.

Quando determinadas análises são efectuadas em laboratório exterior, deve ser anexado o seu resultado ao boletim de resultados do laboratório.

2. Validação Biopatológica

A validação biopatológica consiste na coerência do conjunto de resultados das análises efectuadas para o utente, tendo em conta o seu estado clínico, os tratamentos a que esteve ou está sujeito o utente e os resultados analíticos anteriores.

A validação biopatológica de todos os resultados analíticos assim como a validação do boletim de análises está ao encargo da Directora Técnica do Laboratório – Dra. Fátima Consciência ou da Especialista – Dra. Noélia Piteira.

Sempre que seja necessário para esta validação a repetição de algum parâmetro analítico, caso ainda a amostra biológica apresente estabilidade, cabe à Directora ou à Especialista a solicitação de nova análise a fim de confirmar o resultado obtido.

3. Entrega dos boletins de resultados

O boletim de resultados só pode ser entregue ao utente ou entregue a terceiros em caso de autorização pelo utente. O registo de entrega do boletim de resultados é registado no sistema informático.

A entrega do boletim pode ser feita em mão, num envelope fechado, ou enviada por correio electrónico quando requisitado pelo utente. Quando solicitado ou quando os resultados e o prognóstico assim o sugerir os resultados podem ser comunicados ao médico prescriptor. Também podem ser dados os resultados por via telefónica ou médico prescriptor através da directora técnica. Os boletins de resultados de análises de medicina do trabalho são entregues à empresa requisitante.

BIBLIOGRAFIA

1. Biolabor, (2016). *Manual de colheitas*. Santarém.
2. Biolabor, (2016). *Manual de boas práticas laboratoriais*. Santarém.
3. Robinnns. (2013). *Patologia Básica*. Elseiver.
4. Xavier, R. M. (2005). *Laboratório na Prática Clínica*. Artmed Editora.
5. Failace, R. (2015). *Hemograma - Manual de Interpretação*. Artmed.

Foram ainda consultados os seguintes sites:

1. *ADVIA 2120i Hematology System with Autoslide*. (30 de Janeiro de 2017). Obtido de <https://www.healthcare.siemens.pt/hematology/systems/advia-2120-hematology-system-with-autoslide>.
2. *Analisador de ESR automático*. (30 de Janeiro de 2017). Obtido de <http://www.medicalexpo.es/prod/diesse-diagnostica-senese/product-68223-720535.html>
3. *Artritis Reumatoide: Prevalencia, inmunopatogenia y antígenos relevantes para su diagnóstico*. (Julho de 2016). Obtido de <http://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/artritis-reumatoide-prevalencia-inmunopatogenia-y-antgenos-relevantes-para-su-diagnostico.pdf>.
4. *Automatic hemoglobin analyzer / bench-top / with CRP analyzer*. (30 de Janeiro de 2017). Obtido de <http://www.medicalexpo.com/prod/menarini-diagnostics/product-79119-628131.html>
5. *Biological functions of hCG and hCG-related molecules*. (Junho de 2016). Obtido de <http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-8-102>.
6. *CLINITEK Atlas Automated Urine Chemistry Analyser (Carousel)*. (9 de Fevereiro de 2017). Obtido de <https://www.healthcare.siemens.pt/urinalysis/systems/clinitek-atlas-urine-chem-analyzer>

7. *COBAS E411*. (3 de Fevereiro de 2017). Obtido de <http://realdiagnostica.com.br/siteatual/index.php/produtos-e-servicos/item/22-cobas-e411>.
8. *COBAS INTEGRA® 400 plus*. (3 de Fevereiro de 2017). Obtido de <http://www.cobas.com/home/product/clinical-and-immunochemistry-testing/cobas-integra-400-plus.html>.
9. *Diamond / Sysmex Coagulation*. (30 de Janeiro de 2017). Obtido de <http://www.medlab.com.cy/index.php/products/lab-automation/hemostasis/diamond-sysmex-coagulation-ref>.
10. *Group A Streptococcal (GAS) Disease*. (12 de Julho de 2016). Obtido de <https://www.cdc.gov>.
11. *Hemograma - Como fazer e interpretar*. (30 de Janeiro de 2017). Obtido de http://issuu.com/fernandojaramillo75/docs/hemograma_raimundo_antonio_gomes_ol.
12. *HYDRAGEL IF*. (3 de Fevereiro de 2017). Obtido de <http://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-if>.
13. Giot, J.-F. (2010). Agarose Gel Electrophoresis - Applications in Clinical Chemistry. *Journal of Medical Biochemistry*, 9-14.
14. *Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes e Correlação com Alterações nas Colonoscopias*. (Junho de 2016). Obtido de <http://www.scielo.br/pdf/rbc/v27n3/09.pdf>.
15. *Research Gate - Figure 3 of 7*. (30 de Janeiro de 2017). Obtido de http://www.researchgate.net/figure/259484459_fig3_Fig-3-VolumeHemoglobin-Concentration_VHC-cytogram-Mie-Map-is-a-linear-version-of.
16. *REVIEW - Biological and clinical aspects of ABO blood group*. (Julho de 2016). Obtido de http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol55/pdf/v55_n3-4_p174.pdf.
17. *Sangue nas fezes. Exame de sangue oculto nas fezes*. (7 de Julho de 2016). Obtido de https://www.orientacoesmedicas.com.br/exames-preventivos/sangue-nas-fezes_exame-de-sangue-oculto-nas-fezes/#gs.null.

18. *Siemens Advia 2120i used.* (30 de Janeiro de 2017). Obtido de <http://reagents.myshopify.com/products/siemens-advia-2120i-used>.
19. *Sífilis.* (7 de Julho de 2016). Obtido de <http://www.ebah.pt/content/ABAAAAqAkAK/sifilis>.
20. *Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle.* (Julho de 2016). Obtido de <http://www.scielo.br/pdf/abd/v81n2/v81n02a02.pdf>.
21. *SPG - Shandong Pharmaceutical Glass Co., Ltd.* (30 de Janeiro de 2017). Obtido de http://pt.made-in-china.com/co_chinaglass/product_Blood-Collect-Tube-Pack_hhosiyyiy.html.
22. *Técnica de esfregaço de sangue.* (30 de Janeiro de 2017). Obtido de <http://biologia206.blogspot.pt/2011/07/tecnica-de-esfregaco-de-sangue.html>
23. *The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG.* (Junho de 2016). Obtido de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.502.1169&rep=rep1&type=pdf>.
24. *Thermo SCIENTIFIC - Phadia 100.* (3 de Fevereiro de 2017). Obtido de <http://www.phadia.com/en-GB/5/Phadia-Laboratory-Systems/Phadia-100/>.
25. *VIDAS®.* (3 de Fevereiro de 2017). Obtido de <http://www.biomerieux.com.br/produto/vidasr>
26. *VITEK® 2 Compact: Test Card Setup.* (3 de Fevereiro de 2017). Obtido de <https://www.biomerieuxuniversity.com/vitek-2-compact-test-card-setup.html>.
27. *VITEK® 2: Healthcare.* (1 de Fevereiro de 2017). Obtido de <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>.

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**INFECÇÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV): PATOGÉNESE E
DIAGNÓSTICO**

Ana Rita Nunes Monteiro

Dissertação orientada pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Mestrado em Análises Clínicas

2017

ÍNDICE

Resumo	105
Abstract	106
Introdução	107
Classificação do Vírus	110
1. Taxonomia	110
2. Estrutura do vírus	110
3. Características do vírus	113
Patogénese	114
1. Ciclo Replicativo Viral	116
2. Transmissão	117
3. Expressão Clínica	117
a. Verrugas	118
b. Condiloma	118
c. Carcinoma do Colo do útero	118
d. Outras Expressões Clínicas	119
4. Co-infecção	121
a. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	121
b. Vírus do Herpes Simplex (HSV)	122
Dados Epidemiológicos	123
Diagnóstico	125
1. Testes de rastreio	125
2. Citologia	126
3. DNA	127
4. mRNA	128
Vacina	129
1. Natureza das vacinas	129
2. Guidelines	130
3. Informações Complementares	131

Desafios Futuros	133
1. Clínica	133
2. Diagnóstico	134
Bibliografia	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização taxonómica do HPV	110
Figura 2 – Genoma do HPV	111
Figura 3 – Representação da zona de infecção por HPV	114
Figura 4 – Transformação epitelial de infecção por HPV	117
Figura 5 – Exemplo de verruga da pele	118
Figura 6 – Representação da zona de transformação celular	119
Figura 7 – Exemplo de lesão LSIL / CIN1 na cérvix	126
Figura 8 - Esquema dos níveis de detecção de lesão para o teste DNA e mRNA do HPV	128

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Percentagem de lesões neoplásicas associadas ao HPV entre 2008 e 2012 nos EUA. 123

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Antigen-presenting cell

ASC-H – High-grade Atypical Squamous Cells

ASC-US – Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance

ASO – Adjuvant System 04

CA 125 – Cancer Antigen 125

CD43 – Cluster of Differentiation 43

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CDC6 – Cell Division Cycle 6

CIN – Cervical intraepithelial neoplasia

CKC – Cold-knife Conization

dsDNA – Double-Stranded DNA

EBV – *Epstein-Barr Virus*

FDA – Food and Drug Administration

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

hnRNPA1 – Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1

HPV – *Human Papiloma Virus*

HSIL – High-grade Squamous Intraepithelial Lesion

HSV – *Herpes Simplex Virus*

IFN – Interferon

IL – Interleucinas

IST – Infecção Sexualmente Transmissível

LBC – Liquid-based Cytology

LC – Langerhans Cell

LCR – Long Control Region

LEEP – Loop Electrosurgical Excision Procedure

LSIL – Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion

MCM5 – Minichromosome Maintenance Complex Component 5

MHC – Major Histocompatibility Complex

MPL – Lípido A 3-O-desacilo-4'-monofosforilo

mRNA – Messenger RNA

NK – Natural Killer cells

NLC – Nanostructured Lipid Carriers

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – Open Reading Frame

p16INK4a – Tumor Suppressor Protein

PRR – Papilomatose Respiratória Recorrente

Rb1 – Retinoblastoma 1

SAPN – Self-assembling Protein Nanoparticles

SCC – Squamous Cell Carcinoma

SCJ – Squamo-columnar Junction

SLN – Solid Lipid Nanoparticle

SRSF1 – Serine/Arginine-rich Splicing Factor 1

TA-CIN – Fusion Protein Vaccine

Th – T helper cells

TLR – Toll-like Receptor

TMV – Tobacco Mosaic Virus

VIA – Visual Inspection with Acetic Acid

VLP – Virus-like particles

RESUMO

A presente monografia consiste numa revisão bibliográfica em que o principal objectivo recai na descrição do processo patogénico provocado pela infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) e no processo de diagnóstico da infecção. Para a realização desta monografia, além de artigos de revisão, foram consultados livros e dados obtidos através dos sites oficiais dos CDC (Centers of Disease Control and Prevention) e da Organização Mundial de Saúde.

Na patogénese da doença e para além do ciclo replicativo, são descritos o processo de transmissão, a expressão clínica que deriva desta infecção e as situações em que pode ocorrer co-infecção com outras infecções.

No diagnóstico do HPV são dados a conhecer quais os testes de rastreio utilizados e descritos os processos de detecção do vírus, ou seja, observações citológicas e doseamento dos níveis de DNA e mRNA do HPV.

Além do objectivo principal, é feita também uma contextualização teórica em que o vírus é caracterizado pela sua classificação, são apresentados valores estatísticos, são dadas algumas informações sobre a vacinação, utilizada de forma preventiva na infecção por HPV. Finalmente, e como conclusão final do tema são apresentados desafios futuros tanto ao nível da clínica como do diagnóstico.

O HPV é o principal responsável pelo cancro cervical, mas também pode originar outros tipos de cancro, nomeadamente vulvar, peniano, anal e da orofaringe. O HPV é responsável, numa fase inicial de infecção, pelo aparecimento de verrugas de pele e de condilomas (verrugas da mucosa). A prevenção desta infecção é realizada recorrendo aos vários planos de vacinação disponíveis.

Com esta revisão bibliográfica é possível concluir que para além do avanço de estudos para o desenvolvimento de uma vacinação mais eficaz são necessários métodos mais específicos que permitam o diagnóstico deste tipo de infecção de modo a garantir uma prevenção eficaz e precoce desta patologia.

Palavras-chave: Patogénese; Diagnóstico; HPV; Vírus do Papiloma Humano

ABSTRACT

The present monograph consists of a bibliographical review in which the main objective is the description of the pathogenic process caused by the Human Papillomavirus (HPV) infection as well as its diagnosis. For the accomplishment of this monograph, in addition to review articles, were consulted books obtained through the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the World Health Organization.

Regarding pathogenesis, the replicative cycle is described together with viral transmission mechanisms, the clinical outcomes of this infection, and the problems that may arise in coinfections with other viruses.

In the diagnosis of HPV, the main screening tests are referred (e.g. cytology) as well as the assays aiming the detection of HPV DNA and mRNA.

In addition to the main objective, a general introduction is made in which the virus is characterised, and epidemiological data are presented. Some information about the vaccine, is also highlighted. Finally, challenges that need to be addressed in the near future are presented, both at clinical and diagnostic level.

The HPV is mainly responsible for cervical cancer but can also lead to other cancers, including vulvar, penile, anal and oropharyngeal cancers. It is responsible, at an early stage of infection, for the appearance of skin warts and condyloma (mucosal warts). The prevention of this infection is mainly achieved through vaccination.

With this review it is possible to conclude that in addition to a more effective vaccination, more specific methods are necessary to allow the diagnosis and prognosis of HPV infection in order to guarantee an effective and early prevention of this pathology.

Keywords: Pathogenesis; Diagnosis; HPV; Human Papilloma Virus

INTRODUÇÃO

No ano de 1892, Dimitrii Ivanovsky, associou que a doença mosaico do tabaco – TMV, tem como causa um agente viral. A simplicidade estrutural do vírus é apenas observada anos mais tarde, 1935, por Wendell Stanley, que com a ajuda da microscopia electrónica conseguiu visualizar pela primeira vez a estrutura das partículas virais de TMV. [13]

Com o avançar dos estudos na área de virologia, surgiu em 1960 a necessidade de “catalogação” viral. É proposto em 1962 por Lwoff, Robert Horne e Paul Tournier, classificar os vírus segundo o sistema hierárquico lineano – filo, classe, ordem, família, género e espécie, agrupando assim todos os vírus, ou seja, sem fazer distinção entre infectarem bactérias, plantas ou animais. [13]

Este sistema de classificação não pode ser adoptado na totalidade, pois os vírus devem ser agrupados de acordo com as suas características e com as células ou organismo que lhes serve de hospedeiro. O principal critério de classificação baseia-se no ácido nucleico apresentado no genoma do vírus. Assim sendo o sistema de classificação passa a consistir em família, género e ordem. [13]

Em 1983, Zur Hausen associa o HPV (Vírus do Papiloma Humano) como causador do cancro cervical. Com esta descoberta surge a necessidade de investigar este tipo de vírus e desenvolver métodos de tratamento. [13]

Baseado na classificação taxonómica viral, o HPV apresenta relativamente à natureza do ácido nucleico do virião, genoma dsDNA (DNA de cadeia dupla), nucleocápside icosaédrica, ausência de membrana lipídica – sem invólucro e pequena dimensão do virião e cápside. Com estas características qualificamos o HPV como pertencente à família *Papillomaviridae*. Esta família apresenta vários géneros onde estão agrupados vários genótipos que podem ser distinguidos quanto ao seu poder patogénico e tropismo celular. [5] [13] [56]

Na classificação viral, estamos ainda perante o sistema de classificação de Baltimore, que se caracteriza pela relação entre o genoma viral e o seu mRNA, descrevendo as vias necessárias à formação do último. No sistema de classificação de Baltimore o HPV encontra-se no grupo I. [13] [56]

Os tipos de HPV caracterizam-se pelo seu poder patogénico, sendo agrupados em dois grupos, baixo e alto risco. O grupo de baixo risco é caracterizado pelos genótipos de HPV – 1; 6; 11; entre outros e são responsáveis pelas lesões benignas como verrugas da pele e verrugas genitais. O grupo de alto risco apresenta os genótipos de HPV – 16; 18; entre outros e são responsáveis pelas lesões intraepiteliais de alto grau, assim como pelo cancro cervical, vulvar, vaginal, anal, peniano e da orofarínge. [5] [9] [54]

A patogénese do HPV consiste numa infecção na camada basal das células epiteliais escamosas estratificadas. Esta infecção promove a proliferação celular no epitélio e nas células infectadas, levando a alterações benignas ou malignas. A diferenciação entre as alterações benignas e malignas baseia-se no tropismo celular e no genótipo de HPV que está a infectar o hospedeiro. [5] [9]

A transmissão é feita pelo contacto íntimo através de sexo oral, vaginal ou anal com uma pessoa que esteja infectada, sendo assim uma IST (Infecção Sexualmente Transmissível). A transmissão ocorre mesmo que a pessoa infectada não apresente sinais ou sintomas, pois estes podem desenvolver-se passado anos. [2]

A maioria das infecções é transitória e assintomática, ou seja, não apresenta consequências/sinais clínicos em imunocompetentes. Para que ocorra infecção da camada basal esta tem de sofrer uma ruptura. No período de incubação pode haver novas infecções cervicais, com diferentes genótipos de HPV o que também contribui para a evolução das lesões epiteliais de alto grau assim como a evolução para cancro cervical. [13] [51] [56]

A co-infecção HPV-HIV favorece a infecção celular, uma vez que a infecção pelo HIV favorece o desenvolvimento acelerado de displasias e a evolução para cancro devido à situação de imunossupressão, sendo assim este tipo de co-infecção um círculo vicioso. [1] Na situação de co-infecção com HSV (Vírus do Herpes Simplex), há evolução no sentido da transformação maligna celular, mas não é considerado um factor obrigatório para o avanço de infecção. [30]

As prevalências diferem consoante o tipo de cancro causado pelo HPV. Todos os anos há mais de 27 000 pessoas que desenvolvem cancro devido a infecção por HPV, havendo um novo caso a cada 20 minutos (dados do CDC). Sabe-se que 69% dos cancros da vulva estão associados ao HPV, assim como 75% dos cancros vaginais, 63% dos cancros do pénis, 91%

do cancro anal e 72% do cancro da orofaringe. O cancro do colo do útero é o mais comumente causado pela infecção por HPV.

O teste de rastreio normalmente utilizado é o teste Papanicolau. Este exame permite observar as células anormais (neoplásicas) que se desenvolvem no colo do útero, o que permite agir rapidamente. [41] O teste de Papanicolau está associado à citologia. [65] Além do recurso à citologia, o teste Papanicolau, pode ser utilizado em conjunto com o teste de detecção de DNA do HPV, auxiliando na pesquisa dos diferentes genótipos ou ainda o teste de detecção de mRNA. [5]

Em 2006 surge a primeira vacina contra o HPV, desenvolvida pela MERCK & Co., que permite evitar uma infecção viral potencialmente causadora de neoplasia.

A vacina previne a infecção pela maioria dos tipos responsáveis por causar carcinomas, mas não actua na erradicação da partícula viral. [12]

Cada vez mais nesta área têm surgido novos estudos com o desenvolvimento de outros tipos de vacinas cada vez mais eficazes. Uma nova geração de vacinas e avanços na detecção precoce das lesões precursoras têm sido estudados e desenvolvidos para que este tipo de infecção deixe de ter um impacto tão elevado na saúde pública. [12] [24]

CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS

1. Taxonomia

Taxonomicamente a classificação hierárquica dos vírus apresenta as seguintes subdivisões: Ordem, Família, Género e Estripe (Figura 1).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*. Os principais géneros responsáveis por causar infecção em humanos são *Alphapapillomavirus* com as estripes de HPV – 2; 6; 7; 10; 16; 18; 26; 32; 34; 53; 54; 61 e 71. O género *Betapapillomavirus* com as estripes de HPV – 5; 9 e 49. O género *Gammapapillomavirus* com as estripes de HPV – 4; 48; 50; 60 e 88. O género *Nupapillomavirus* com a estripe de HPV – 41. O género *Mupapillomavirus* com as estripes de HPV – 1 e 63. [9] [31]

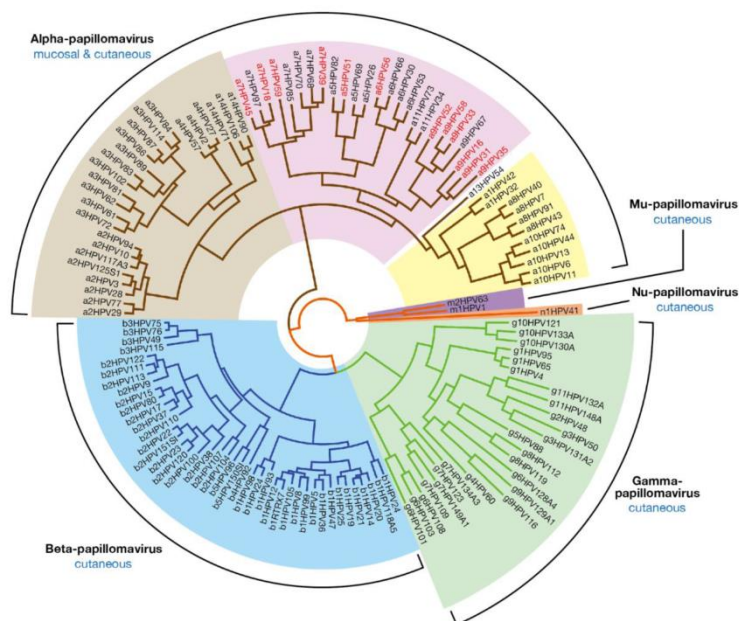


Figura 1 - Esquematização taxonómica do HPV. Adaptado de Egawa, N. et al., 2015 [9].

2. Estrutura do vírus

O HPV apresenta genoma DNA de cadeia dupla circular com dimensões entre 5 a 8 Kb. A sua replicação é nuclear podendo em alguns casos ocorrer integração do seu genoma no genoma da célula hospedeira. [5] [27] [45] [53]

O virião é formado pelas proteínas precoces e tardias e pelo ácido nucleico. Apresenta dimensão entre 45 a 55 nm, forma icosaédrica e ausência de invólucro lipídico. [5] [45]

A estrutura do genoma viral é dividida em três regiões: Long Control Region (Região Longa de Controlo - LCR), Early Region (Região Precoce) e Late Region (Região Tardia) (Figura 2). [5] [27] [45] Entre a LCR e a região precoce encontra-se a zona de poliadenilação precoce e no final da região tardia encontra-se a zona de poliadenilação tardia. [26]

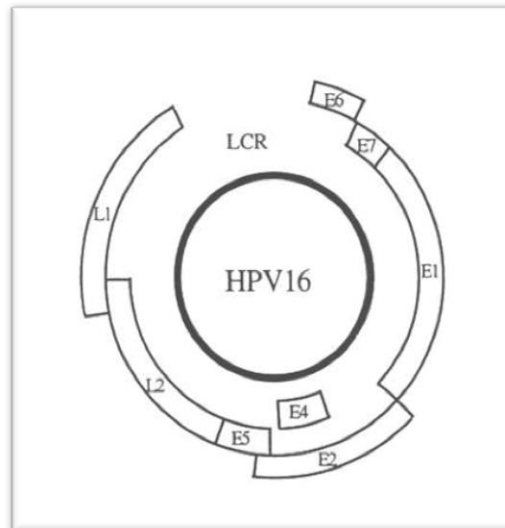


Figura 2 – Representação do genoma do HPV – 16. Adaptado de <http://win.eurocytology.eu/static/EUROCYTOLOGY/TUR/cervical/LPIContentMcontA1.html> [20]

A LCR é a região reguladora não codificante que varia consoante os diferentes genótipos de HPV, ou seja, varia a sua composição nucleotídica. Encontra-se entre as proteínas E6 e L1 e contém a sequência promotora nuclear onde se localizam os silenciadores e “enhancers” (potenciadores), que promovem o reconhecimento e ligação às proteínas necessárias para a replicação e transcrição viral, assim como a origem de replicação. A sua composição nucleotídica varia de acordo com os diferentes genótipos de HPV. [5] [27] [31]

Entende-se por “enhancer” a sequência de DNA que contém múltiplos elementos que podem estimular a transcrição da RNA polimerase II que actuam independentemente da orientação e local de início da transcrição, funcionando assim como um potenciador. [13] [56]

A Região Precoce é composta por seis proteínas – E1; E2; E4; E5; E6 e E7. As principais características destas proteínas são a replicação viral, a regulação da transcrição e a oncogénese. [5] [27] [31]

E1 permite a replicação episomal, pois actua como helicase replicativa específica do DNA viral. [9]

E2 está envolvida no processo de transcrição, replicação e tradução do genoma viral. Actua como um factor de processamento de RNA controlando o splicing e a poliadenilação precoce. Regula a transcrição viral e inibe as proteínas E6 e E7. [9]

As proteínas E1 e E2 são as responsáveis pela replicação viral. [9]

E4 promove a deformação das células infectadas pela destruição da rede citoesquelética (coilocitose) e continua a sua expressão nas células epiteliais na fase final de diferenciação. Esta proteína associa-se a L1 e L2. [27] A coilocitose caracteriza-se por células que apresentam pequenos vacúolos em volta do núcleo. [28]

E5 pode ligar-se ao factor de crescimento epidérmico. Tem uma faca actividade na transformação celular e a sua expressão acaba quando há a integração do genoma viral. [8]

As proteínas E6 e E7 são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão para o cancro. A proteína E6 é caracterizada pela ligação ao gene supressor tumoral – p53 que promove danos na reparação do DNA, com destabilização do cromossoma e inibição da apoptose. A proteína E7 é caracterizada pela ligação à proteína retinoblastoma – pRb, que promove a supressão tumoral, desregulação do ciclo celular, interacção com outras proteínas celulares, inibição da apoptose e evasão das funções de vigilância imunológica. [5]

A Região Tardia apresenta as proteínas L1 e L2. São proteínas estruturais e é nesta região que estão localizadas as ORF's tardias. Estas proteínas formam a cápside e protegem o genoma viral. São expressas na camada superior do epitélio. Promovem a ligação ao DNA viral facilitando a encapsidação do genoma. [5] [27] [31]

A proteína L1 é caracterizada por imunogenicidade semelhante à dos viriões infectados e tem como factor-chave o poder de se agrupar a estruturas vazias da cápside. É a responsável por codificar a proteína estrutural da cápside do vírus. [5]

A proteína L2 é responsável pela produção de um amplo espectro de anticorpos neutralizantes contra os diferentes genótipos de HPV. É essencial para a entrada do vírus na célula, com transporte dos componentes virais para o núcleo onde ocorre a ligação ao DNA. [5]

3. Características do vírus

O HPV apresenta tropismo para as células epiteliais, nomeadamente as células da pele e das mucosas. [5] [27]

Os genótipos do HPV são sub-divididos em alto e baixo risco. São genótipos de alto risco o HPV – 16; 18 (mais comuns e responsáveis por 71% do cancro cervical) além de 31; 33; 35; 39; 45; 51; 52; 56; 58; 59; 66; 68. São genótipos de baixo risco o HPV – 6 e 11 que contribuem para a formação de verrugas. [5]

Os genótipos de alto e baixo risco diferenciam-se ao nível das proteínas E6 e E7, reguladoras do controlo da expressão génica. No HPV de alto risco há um único promotor e a regulação ocorre por splicing diferencial, já no HPV de baixo risco as proteínas têm promotores separados para regular a sua expressão. [9]

O splicing diferencial permite que a cadeia sintetizada de mRNA sofra vários processamentos. Há aumento do número total de proteínas possíveis com remoção dos intrões de diferentes sítios o que leva a mais exões diferentes. O resultado deste processo são diferentes RNAs. [13] [56]

A transmissão pode ocorrer por contacto directo, por via sexual, ou por via congénita. Expressa-se clinicamente por verrugas na pele, verrugas genitais ou condilomas e cancro cervical, no estado avançado de infecção. [2]

PATOGÉNESE

A patogenicidade do HPV além de variar com o genótipo, varia com a natureza da célula infectada e com a imunidade do hospedeiro. [9]

É característico dos vírus genoma DNA a infecção abortiva/ não produtiva e a capacidade oncogénica. Neste tipo de genótipo ocorre alteração da actividade celular no controlo do crescimento e na inibição das proteínas celulares, devido à expressão desregulada da proteína E6 e E7 que leva à instabilidade do genoma. [9]

O HPV infecta as células basais que se encontram na zona de transformação epitelial, entre o epitélio escamoso estratificado do ectocérvix e o epitélio colunar do endocérvix, facilitando assim a entrada do HPV (Figura 3). Como o HPV infecta apenas as células epiteliais basais em divisão, apenas há replicação de DNA do HPV quando há replicação do DNA das células basais. [5]

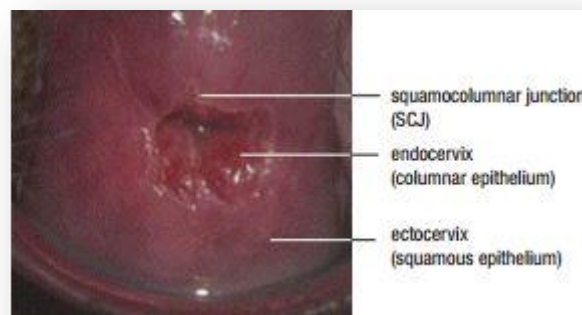


Figura 3 - Representação da zona de infecção por HPV. *Adaptado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144785/1/9789241548953_eng.pdf?ua=1* [41]

A aquisição de infecção viral é dependente, por exemplo, da imunodeficiência, mas a sua persistência é independente de outras infecções. [50]

A persistência de infecção traduz-se na forma de infecção latente não produtiva, originando lesões que não são clinicamente aparentes. Uma situação de infecção persistente com um ou mais genótipos é iniciada com uma lesão epitelial de baixo grau, passando depois para uma lesão epitelial de alto grau, até chegar à situação de cancro cervical invasivo. Esta situação de progressão deve-se ao facto de não haver libertação de citocinas pró-inflamatórias nem recrutamento das células de Langerhans (LC). [9]

O tempo médio de persistência viral pode chegar aos 14 meses. [22]

Além da aquisição viral e imunocomprometimento, o tabagismo e os contraceptivos orais também são considerados factores de risco para o agravamento da infecção. [23]

A infecção pelo HPV leva a alteração da resposta imune adaptativa e inata. [9]

A resposta inata é constituída por barreiras físicas, fisiológicas, celulares e inflamatórias próprias do organismo. Como barreira física podemos encontrar a pele, como fisiológica podemos ter mediadores químicos, nomeadamente as lisozimas, o interferão ou o sistema do complemento. As barreiras celulares promovem a fagocitose e são constituídas pelos linfócitos NK (Natural Killer) e pelos leucócitos fagocitários (neutrófilos, monócitos) e macrófagos. A barreira inflamatória é a responsável por induzir as células fagocitárias. [13] [56]

A resposta adaptativa consiste na imunidade humoral e celular específica após o contacto com o agente invasor. [13] [56]

Depende da apresentação cruzada do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APC), que neste caso são as células de Langerhans. Estas apresentam o antígeno através do MHC II. [56] As LC localizam-se na pele e mucosas. O HPV ao ligar-se à membrana celular pode alterar a conformação da cápside, expondo L1 e/ou L2 o que leva à supressão da activação das LC. [10]

As LC ligam-se aos linfócitos T CD4+ activando-os. Da activação resultam dois tipos de resposta. A resposta Th1 activa os macrófagos e aumento da produção de factores inflamatórios, nomeadamente a produção de citocinas (IL2); IFN gama e IFN beta. A resposta Th2 activa os linfócitos B que vão produzir imunoglobulinas/ anticorpos contra o antígeno, gerando uma resposta do tipo humoral. (produção de IL4 e 5) [13] [56]

O mecanismo de defesa inata do hospedeiro contra a infecção viral ocorre através do receptor Toll-like (TLR), pela via do Interferão e pela via da Apoptose. [4]

O TLR 9 é um exemplo de receptor de reconhecimento de patógenos, que está associado ao mecanismo de defesa contra a infecção por HPV. É responsável pela produção de citocinas imunoestimuladoras e pró-inflamatórias onde se inclui o interferão tipo 1 (IFN-1). [17]

Na persistência de infecção viral do HPV – 16, há diminuição da regulação de transcrição do TLR9, devido há perda de produção do IFN-1. Para o HPV- 6 não há alterações de transcrição de TLR 9. As proteínas E6 e E7 actuam contra a resposta imune do hospedeiro bloqueando a resposta viral proveniente de IFN. [59]

1. Ciclo Replicativo Viral

O início da replicação viral ocorre com a entrada do vírus na célula hospedeira, associando-se ao ciclo de diferenciação das células epiteliais. [5] Após a entrada o DNA viral fica no núcleo sob a forma de DNA epissomal. [18] A manutenção do genoma viral nas células hospedeiras é promovida por E1 e E2, uma vez que são estas proteínas que iniciam a replicação do DNA viral pelo recrutamento da DNA polimerase celular. E6 e E7 vão actuar no aumento da proliferação celular com aumento do número de células infectadas e aumento do número de viriões infecciosos. Após a infecção do tecido epitelial normal há sobreexpressão dos genes virais e transformação das células epiteliais infectadas em células malignas, levando a Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN) que por sua vez vai levar a Carcinoma in situ com desenvolvimento em cancro cervical. [5]

Há medida que ocorre a divisão celular na camada basal há migração para a camada epitelial superior de “células-filhas”. As células epiteliais não infectadas saem do ciclo replicativo celular e iniciam o processo final de diferenciação. [18]

Na divisão das células epiteliais basais há manutenção do baixo número de cópias de DNA viral. As células epiteliais infectadas que já não se encontram em divisão amplificam o número de cópias de DNA e ocorre o processo de encapsidação promovido por L1 e L2. [9] [51] E4 actua com a função de libertar/transmitir o vírus. [9]

O ciclo de replicação viral por ser finalizado em diferentes locais consoante a natureza da célula infectada, ou seja, pode ocorrer na epiderme, no tracto anogenital ou na cavidade oral. [9]

Os genes precoces são expressos ao longo do ciclo replicativo viral, já os genes tardios são expressos apenas quando as células epiteliais se encontram na fase final de diferenciação. [51]

2. Transmissão

A transmissão deste vírus pode ocorrer de forma directa, por via sexual ou por via congénita. A propagação do vírus ocorre pelo contacto entre a pele ou mucosa e os fluídos que contactam com a área genital, anal ou orofaríngea. [2]

Apenas ocorre infecção por parte do HPV quando há lesão da camada basal, que permite a penetração do vírus na camada superior da pele e mucosas. [51]

3. Expressão Clínica

A infecção por HPV varia a sua expressão consoante o local em que ocorre a infecção, nomeadamente o epitélio cutâneo dando origem às verrugas epiteliais ou o epitélio da mucosa, originando os condilomas e, em estado mais avançado, o cancro. [27]

A neoplasia intraepitelial cervical divide-se em quatro fases (Figura 4). Na fase CIN 1, não são observadas células displásicas e normalmente não é necessário tratamento. Na fase CIN 2, as células apresentam uma displasia moderada com 2/3 das células cervicais anormais. Na fase CIN 3, há uma displasia severa, com todas as células anormais. Após esta fase temos o CIS – carcinoma in situ, a partir do qual ocorre o desenvolvimento do cancro cervical. [41]

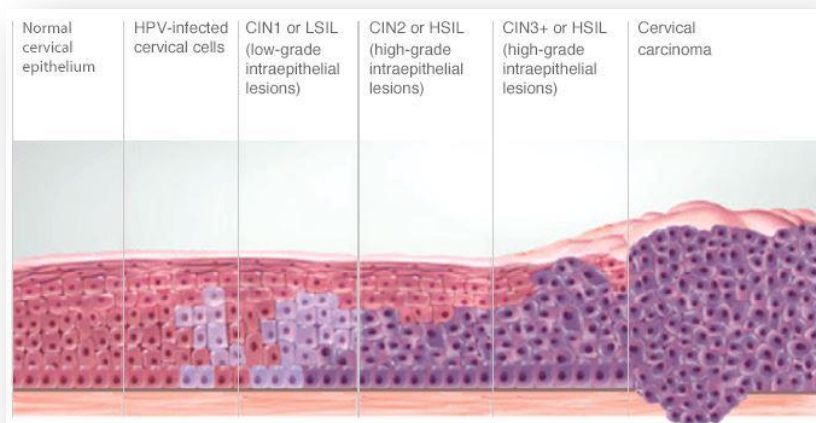


Figura 4 – Representação das fases de transformação epitelial que derivam da infecção por HPV. Adaptado de <http://www.aptimaforher.com> [7]

a. Verrugas

As verrugas da pele (Figura 5) são lesões benignas causadas pelos genótipos de baixo risco 6 e 11. [5] [9] Além do tecido epitelial, este tipo de verrugas pode ser ainda encontrado no tecido conjuntivo, nasal, oral ou da laringe. [41]

A infecção por HPV que afecta a pele é normalmente assintomática e as lesões que surgem deste tipo de infecção apenas se tornam visíveis quando é comprometida a resposta imune do hospedeiro. Nos indivíduos imunocomprometidos esta infecção expressa-se através de papilomas visíveis. [9]



Estas lesões são normalmente assintomáticas e regridem normalmente. [9] Apenas há progressão quando há quebra da resposta imune do hospedeiro. Podem desenvolver-se em lesões epiteliais de alto grau, promovendo o desenvolvimento de cancro invasivo. [9]

Figura 5 – Representação de verruga da pele associada à infecção por HPV. Adaptado de Leto, M. D. et al., 2011 [31]

b. Condiloma

Entende-se por condiloma, as verrugas que se encontram na mucosa genital. Este tipo de infecção é sub-clínico, ou seja, assintomático. Tal como as verrugas da pele podem desaparecer espontaneamente. A maioria destas verrugas é causada pelo HPV – 6, 11 ou 13. Outros tipos podem ser encontrados como resultado de co-infecção. Apresentam um crescimento plano, papuloso ou pedunculoso e são diagnosticadas por exame visual. [41]

A regressão das verrugas da zona anogenital é acompanhada pela resposta Th1 das células T CD4+. [9]

c. Carcinoma do Colo do útero

Este é o resultado final da infecção por HPV que depende da sua persistência ao longo dos anos. [5]

A transformação celular ocorre quase que exclusivamente nas células da junção colunar escamosa – SCJ (Figura 6). A SCJ é a junção entre o epitélio glandular e o epitélio escamoso do colo do útero. [41] [45]

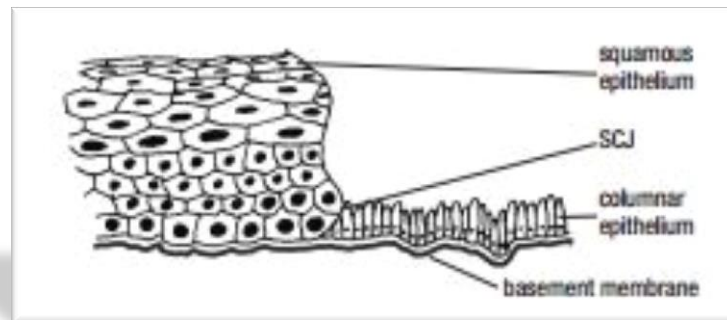


Figura 6 - Representação da zona de transformação celular que ocorre na situação de Carcinoma do colo do útero. Adaptado de <http://win.eurocytology.eu/static/EUROCYTOLOGY/TUR/cervical/LP1ContentMcontA1.html> [20]

A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), classifica o carcinoma do colo do útero em quatro estádios. Na fase I, o cancro está limitado apenas ao colo do útero. Na fase II, o cancro inclui além do colo do útero, a parte superior da vagina ou o paramétrio (área entre o útero e a parede pélvica). Na fase III, o cancro ocupa a zona inferior vaginal e toda a região desde o paramétrio até à parede lateral da pelve. Na fase IV, o cancro envolve os órgãos circundantes com o poder de chegar a tecidos distantes. [41]

d. Outras Expressões Clínicas

Segundo um estudo de Rodriguez-Cerdeira, 2012, é demonstrado que *Gardnerella vaginalis* encontra-se frequentemente em mulheres infectadas com o HPV.

No mesmo estudo, os autores ponderam a possibilidade de *Trichomonas vaginalis* alterar a patogénese dos genótipos de alto risco de HPV, com aumento da sua virulência. Há associação significativa aos tipos 18, 45, 66 e 68. A associação entre vaginose bacteriana e HPV de alto risco é encontrada nos genótipos 16, 31, 33, 35 e 52.

Pensa-se que há ligação entre as infecções do tracto genital e a infecção causada pelo HPV na evolução para neoplasia cervical. Os microrganismos responsáveis pelas vaginoses bacterianas assim como os responsáveis pela tricomoníase podem levar à danificação do

epitélio vaginal, com quebra da barreira física, facilitando a infecção e a proliferação viral. [49]

No estudo de Rivera-Acosta et al, 2016, é descrito que pacientes com doenças inflamatórias intestinais apresentam risco aumentado de desenvolver displasia cervical. Este risco está associado ao uso da terapia imunossupressora, que promove a alteração da resposta imune contra novas infecções, neste caso contra o HPV. [48]

O cancro da orofarínge está associado ao genótipo HPV – 16 e ao sexo orogenital. Este tipo de cancro não é necessariamente devido à integração viral, uma vez que pode ocorrer quando o vírus está na forma episomal. As infecções resultante do HPV são transitórias e o epitélio oral e da orofarínge podem servir apenas como um reservatório viral, uma vez que o vírus pode encontrar-se em estado de latência, provocando posteriormente infecção, ao haver replicação celular. É demonstrado que apesar de em alguns casos não ser expresso o mRNA das proteínas E6 e E7, o vírus pode actuar na transformação epitelial num estadio inicial. [11] [39]

A papilomatose respiratória recorrente (PRR) provocada por HPV é uma condição rara que se caracteriza pelo crescimento de verrugas na garganta. É causada pelos genótipos de baixo risco 6 e 11. As mulheres grávidas ao apresentarem lesões genitais, apresentam uma grande probabilidade de infectarem os filhos na altura do parto uma vez que a passagem pelo canal de parto leva ao contacto com as lesões, ou através da placenta, levando a infecções orais e orofaríngeas. Não está totalmente compreendida como ocorre a transmissão. [6] [11] [38]

O tipo mais comum de cancro anal é o carcinoma das células escamosas (SCC). É iniciado nas células planas que revestem o canal anal. O risco de contrair cancro anal é causado principalmente pela persistência da infecção por HPV. Sabe-se que a vacinação precoce diminui o risco de evolução para cancro. [37]

4. Co-infecção

A co-infecção pode resultar de uma infecção com novos genótipos de HPV ou estar associada à infecção com outros vírus. Esta situação resulta no aumento da persistência viral. [1]

Está demonstrada a associação entre determinados genótipos de HPV com a aquisição de infecção com outros tipos. [50] [34] Uma infecção prévia com o HPV – 16 associa-se ao aumento do risco de aquisição de outros genótipos de HPV. No caso de infecção com HPV – 18, é possível adquirir infecção com os genótipos 31, 39 e 45. Uma infecção inicial com os genótipos 16 e 18, é possível que se adquira infecção com o genótipo 58. [34]

a. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A infecção pelo HIV aumenta o risco de cancro cervical, uma vez que esta condição leva a maior susceptibilidade para infecções persistentes. O agravamento do estado de imunodeficiência leva ao desenvolvimento de displasias cervicais. [1]

Devido à imunossupressão causada pelo HIV, é mais frequente surgir carcinoma das células escamosas. Deve ser feita biópsia na altura do rastreio para confirmação de resultados suspeitos. No estudo de Odone, A. *et al* está comprovado que as mulheres que apresentam infecção com HIV apresentam aumento do risco de desenvolver cancro cervical. [39]

Doentes co-infectados com HIV tem o dobro da probabilidade de apresentarem testes Pap com resultados anormais e esta probabilidade ainda se torna maior se a infecção provocada pelo HPV resultar de vários genótipos. [1]

Há aumento da incidência de cancro anal em homossexuais masculinos que se encontrem co-infectados com HPV e HIV. [32] [37] Nesta situação a citologia é recomendada para o rastreio de neoplasia intraepitelial normal. [32]

Está demonstrado que as mulheres da África do Sul portadoras de infecção por HIV têm um risco aumentado de desenvolver cancro cervical. [40]

Conclui-se que a infecção por HIV está associada ao aumento do risco de desenvolver cancro cervical.

b. Vírus do Herpes Simplex (HSV)

A infecção pelo Vírus do Herpes Simplex (HSV), não é um factor obrigatório para a progressão da infecção por HPV. A associação entre os dois vírus leva ao aumento da replicação dos genótipos de alto risco com aumento da expressão de E6 e E7. [30]

Conclui-se que este processo contribui para a indução de transformação maligna nas células epiteliais.

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Segundo dados do CDC, entre 2008 e 2012, identificaram-se 38 793 câncros associados ao HPV por ano. Destes 23 000 correspondem a mulheres e 15 793 a homens.

Tabela 1 – Percentagem de lesões neoplásicas associadas ao HPV entre 2008 e 2012 nos EUA. Adaptado de <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6526a1.html> [61]

	Mulheres	Homens	Associados aos genótipos de HPV – 16 e 18	Associados aos genótipos de HPV – 31; 33; 45; 52 e 58	Associados aos genótipos de HPV – 16; 18; 31; 33; 45; 52 e 58
Carcinoma Cervical	11 771		7 800	1 700	9 500
SCC Vaginal	802		400	100	600
SCC Vulvar	3 554		1 700	500	2 200
SCC Rectal	513	237	600	100	700
SCC Anal	3 260	1 750	4 000	400	4 400
SCC Peniano		1 168	600	100	700
SCC Orofaringe	3 100	12 638	9 500	900	10 400
TOTAL	23 000	15 793			

Como está representado na tabela 1, o Carcinoma das Células Escamosas (SCC) da orofaringe é mais prevalente em homens que em mulheres e na maioria dos casos está associado ao conjunto de genótipos de alto risco ou apenas aos genótipos 16 e 18. O SCC rectal e anal apresenta uma pequena predominância em mulheres. O cancro causado pelo HPV mais frequente em mulheres é o carcinoma cervical e em homens é o SCC da

orofarínge. O cancro que predomina na associação dos genótipos 16 e 18 é o SCC da orofarínge. [61]

Sabe-se que o genótipo do HPV – 16 é o mais persistente e o que apresenta uma maior progressão para o estado de cancro. [3] A infecção por HPV é responsável por 40% dos cancros dos órgãos genitais externos, 30-40% dos cancros orofaríngeos e 90% dos cancros anais [58] e relativamente ao cancro do colo do útero estima-se 500 000 casos diagnosticados por ano com 1 200 000 mortes anuais. [46]

Os genótipos 18, 31, 39, 51, 52, 56 e 58, apresentam uma prevalência semelhante entre si e sabe-se que 70% de infecções com citologias normais são devidas aos genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59. [3]

Na Europa e América Latina o genótipo do HPV – 31 é o mais comum, já na América do Norte e Ásia o genótipo do HPV – 52 é o mais prevalente. [3] No caso da China os genótipos de alto risco prevalentes são 16, 18, 31, 33, 35 e 58 e os genótipos de baixo risco prevalentes são 6, 11 e 81. [63] Em Portugal o cancro do colo do útero é o quarto mais prevalente com 950 diagnósticos e 378 mortes por ano, sendo os genótipos de alto risco com maior frequência o HPV – 16 e 31. [24]

Na Inglaterra, após a introdução do programa de vacinação com Cervarix® (2008), verifica-se uma diminuição do número de diagnósticos de verrugas genitais, o que indica indução de protecção cruzada contra os genótipos 6 e 11 do HPV. Na Austrália após a introdução da vacina Gardasil® (2007), há diminuição dos diagnósticos de verrugas genitais. Resultados esperados, pois a vacina inclui os genótipos do HPV – 6 e 11. [19]

DIAGNÓSTICO

A prevalência dos genótipos de alto risco de HPV diminui com o aumento da idade, provavelmente devido à vacinação precoce. [45] [57]

A detecção da infecção pelo HPV apresenta um pico após o início das relações sexuais (± 15 anos), sendo esta normalmente uma situação transitória. Um novo pico de detecção ocorre numa idade mais avançada, o que pode ser explicado pela persistência da infecção viral. [3]

O processo de triagem é bastante importante na prevenção da progressão de lesões de baixo grau para o carcinoma invasivo. Este deve ser baseado em métodos com elevada sensibilidade e especificidade, uma vez que a progressão deve-se à persistência de infecção pelo HPV, alteração da expressão de E6 e E7, inactivação de E2 e factores ligados ao hospedeiro (influência na resposta imune). [66]

1. Testes de rastreio

Os testes de rastreio servem para detectar precocemente alterações da cérvix, antes do desenvolvimento de cancro. Podem ser utilizados três tipos de teste de rastreio. O teste convencional – Teste Papanicolau (Pap test) e citologia líquida (LBC), a inspecção visual com ácido acético (VIA) e o teste de HPV para os genótipos de alto risco. O teste VIA não deve ser utilizado em mulheres com mais de 50 anos. A SCJ é afastada para o canal endocervical na menopausa o que dificulta a visualização de lesões celulares. [41]

Habitualmente é utilizado o teste Papanicolau. As alterações verificadas por este teste normalmente devem ser acompanhadas pela biópsia do tecido afectado. A partir da biópsia podemos classificar a displasia cervical em diferentes graus – lesão intraepitelial de baixo grau (CIN 1), lesão intraepitelial de alto grau (CIN 2) e displasia cervical (CIN 3). Este teste demonstra uma baixa sensibilidade com resultados falsos negativos e baixa especificidade com resultados falsos positivos. [65]

Apenas são recomendados testes de rastreio para a detecção e acompanhamento do cancro cervical. O cancro anal, peniano e da orofaringe não tem um teste de triagem recomendado. [41]

A triagem cervical aprovada pela FDA faz uso do teste de DNA do HPV. Segundo as guidelines da American Cancer Society 2012, o teste de DNA do HPV deve ser utilizado em conjunto com a citologia. As guidelines da National Comprehensive Cancer Network recomendam a realização do teste de DNA do HPV juntamente com o teste Papanicolau a mulheres entre os 30-55 anos, com intervalos de 5 anos. Em caso de resultado positivo é recomendada a realização de colposcopia. [5] Esta é recomendada no acompanhamento de mulheres que apresentem resultados anormais no teste Papanicolau, pode ser combinado com o teste Papanicolau em mulheres com mais de 30 anos e é utilizado com teste de primeira linha no rastreio de mulheres com mais de 25 anos. Nas mulheres entre os 21 e os 65 anos o rastreio é feito através do teste Papanicolau. [47]

2. Citologia

É exemplo de teste citológico de rastreio, o teste Papanicolau.

Na citologia as observações são divididas em grupos de baixo e alto grau. No grupo de baixo grau são observadas células escamosas atípicas com significância indeterminada (ASC-US), células escamosas atípicas de alto grau (ASC-H) e lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) (Figura 7). No grupo de alto grau observamos as lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL). [36]

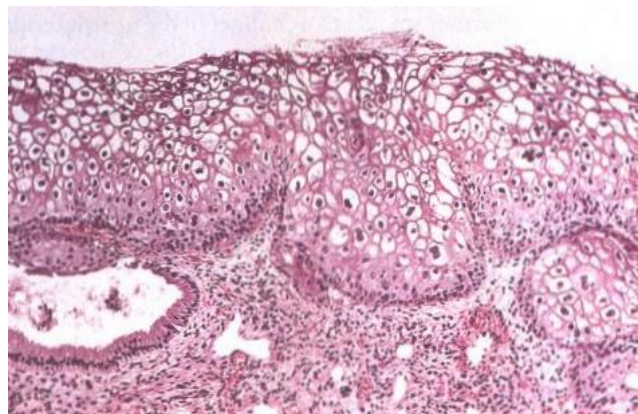


Figura 7 - Representação de lesão LSIL / CIN1 na cérvix, resultado de infecção por HPV. Adaptado de <http://win.eurocytology.eu/static/EUROCYTOLOGY/TUR/cervical/LP1ContentMcontA1.html> [20]

A triagem cervical com o teste Papanicolau deve ser iniciada 3 anos após o início da actividade sexual. [47] Juntamente com o teste Papanicolau, muitas vezes há a necessidade de utilizar os testes de DNA do HPV. [57]

Mulheres que apresentem no teste Papanicolau um resultado de ASC-H ou LSIL devem ser encaminhadas para a realização de colposcopia e/ou biópsia com repetição do teste Papanicolau após 1 e 2 anos. [47] Este seguimento não é recomendado para mulheres com menos de 21 anos, pois nesta idade a infecção pode se resolver por si, sem necessidade de outras intervenções. [41] As mulheres com mais de 21 anos que apresentem no teste

Papanicolau resultado ASC-US devem fazer de imediato colposcopia e repetição do teste de Pap aos 6 e 12 meses ou fazer o teste de DNA do HPV de alto risco. [47]

Na situação de co-infecção com o HIV e em casos de resultados citológicos ASC-H, LSIL ou HSIL, deve ser feita uma avaliação por colposcopia ou pelo teste de DNA do HPV. [47] A colposcopia permite examinar o colo do útero, vagina e vulva, nomeadamente a camada epitelial e os vasos sanguíneos circundantes. É utilizada quando os testes de rastreio revelam um resultado positivo e serve também de guia quando é necessário realizar biópsia de áreas anormais, ou seja, que apresentem evolução celular neoplásica. [41]

3. DNA

Neste ensaio pesquisa-se a presença de ácido nucleico viral – DNA. Um resultado positivo não é indicativo de existência de pré-cancro, apenas indica a existência de infecção provocada pelo HPV. [21] É utilizado no seguimento após tratamento de lesões CIN de modo a monitorizar a recorrência de infecção. [5]

Detecta níveis muito baixos de DNA viral, o que leva a um resultado fiável. Estima o risco de lesão cervical de alto grau e é importante quando a citologia apresenta um resultado normal, uma vez que podemos estar perante um resultado falso negativo. [45] Além disso, apresenta melhor taxa de detecção para lesões precursoras quando comparado com o Teste Papanicolau. [41] [45] [54]

A Society of Gynecologic Oncology e a American Society for Colposcopy and Cervical Pathology aprovou o uso do teste de DNA do HPV para mulheres com mais de 25 anos, com intervalo de 3 anos. [5]

Nos EUA existem dois tipos de teste de DNA do HPV. Testes que detectam qualquer um dos tipos de HPV de alto risco mais comuns - Hybrid Capture 2™, ou mais específicos para os genótipos de HPV – 16 e 18 - Cervista® HPV 16 / 18. Existem ainda testes que, além da detecção dos genótipos mais comuns de alto risco de HPV, detectam cinco dos genótipos de baixo risco - Digene® HC2. [47]

É recomendado para a triagem em mulheres com mais de 21 anos que apresentem teste de Papanicolau anormal, nomeadamente ASC-H. As mulheres com mais de 21 anos que apresentem no teste Papanicolau lesões do tipo ASC-US, devem realizar o teste de DNA do

HPV de alto risco. Se o teste de DNA do HPV de alto risco apresentar um resultado negativo, deve ser repetido o teste de Papanicolau ao fim de 1 ano. [47]

4. mRNA

Neste ensaio pesquisa-se a presença do RNA mensageiro das proteínas da cápside. Pode ser utilizado em alternativa ao teste de DNA do HPV. Neste caso são avaliadas os mRNA das proteínas E6 e E7. [21]

Este teste apresenta maior especificidade quando comparado com o teste de DNA do HPV, mas menor sensibilidade (Figura 8). [16] [47]

O teste de mRNA apenas apresenta resultado positivo quando há sobreexpressão das proteínas E6 e E7 do HPV, ou seja, na progressão da infecção para o cancro do colo do útero. [21] Pode ser utilizado como um biomarcador de prognóstico nas situações de DNA do HPV com resultado positivo e colposcopia ou histologia negativa [16]

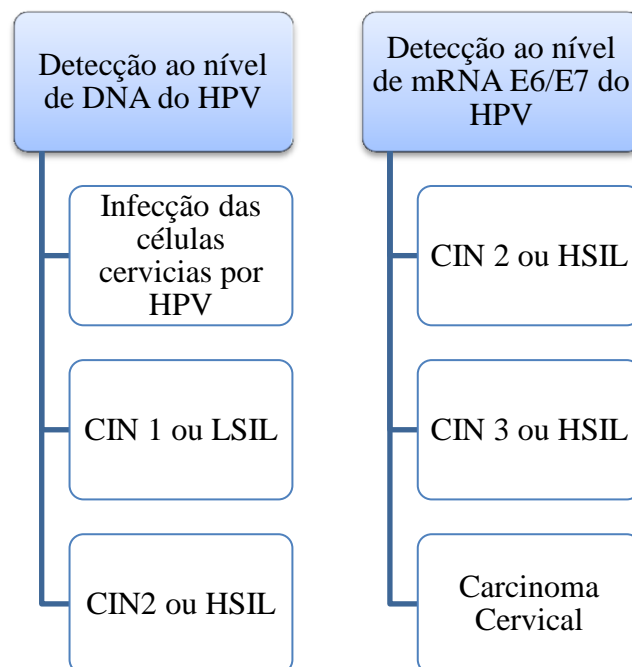


Figura 8 – Relação entre os diferentes níveis de detecção de lesão para o teste DNA e mRNA do HPV. Adaptado de <http://www.aptimaforher.com> [7]

VACINA

1. Natureza das vacinas

Existem dois tipos de vacinas: a vacina profiláctica ou preventiva que previne a infecção causada pelo HPV e a neoplasia, do colo do útero e a vacina terapêutica que induz a depuração viral e a regressão de lesões pré-cancerosas. [35]

As VLP (vírus like particles) são partículas não infecciosas, neste caso de HPV, compostas pela proteína da cápside L1. Apresentam morfologia e acção imunológica semelhante aos viriões, apenas não contêm o genoma do vírus, daí serem partículas não infecciosas fortes candidatas para a prevenção de infecção por HPV e de neoplasia cervical. [46]

As VLP L1 do HPV – 16 levam à maturação das LC, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas o que coincide com o aumento da migração destas células e com a indução de resposta pelos linfócitos T CD8+. Devido a este mecanismo, a vacinação induz a resposta das células T citotóxicas (CD8+) contra as células infectadas. [10]

Nos ensaios realizados com as vacinas baseadas nas VLP L1, verifica-se uma resposta humoral forte, com aumento da resposta linfoproliferativa independentemente da concentração de VLP L1. Após imunização verifica-se um aumento significativo da proliferação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ assim como das citocinas IFN- γ (Th1) e IL-10 (Th2). [46]

As vacinas baseadas nas VLP L1 de HPV não produzem efeito terapêutico se pré-existirem infecções com HPV. [35]

Cervarix® é a primeira vacina contra o HPV. Trata-se de uma vacina recombinante bivalente que utiliza como adjuvante ASO 4 (contém lípido A 3-O-desacilo-4'-monofosforilo (MPL) adsorvido em hidróxido de alumínio hidratado) e é composta por VLP. As VLP são formadas pela proteína L1 do HPV – 16 e 18. Foi licenciada em 2006 e confere protecção contra o cancro cervical. [25] [29] [35] [41] [43] [62]

Gardasil® é uma vacina recombinante tetravalente adsorvida em adjuvante amorfo de sulfato de hidroxifosfato de alumínio juntamente com VLP L1 de HPV – 6, 11, 16 e 18. Foi licenciada em 2006 e confere protecção contra o cancro cervical e as verrugas genitais. [25] [29] [41] [43] [62]

Está demonstrado que a vacina Gardasil® aumenta a resposta humoral e a resposta das células de memória dos linfócitos B, persistindo esta imunidade durante aproximadamente cinco anos. [11]

Gardasil 9® é uma vacina que apresenta constituição semelhante a Gardasil®, mas que inclui além das VLP L1 de HPV já apresentadas, as VLP L1 de HPV – 31, 33, 45, 52 e 58. Foi licenciada em 2014 e confere protecção semelhante a Gardasil®. [25] [29] [41] [60]

A vacina Gardasil 9® aumenta a taxa de protecção do cancro cervical, passando de 70 para 90%. Está demonstrado que previne o cancro cervical, vulvar e vaginal e ainda a persistência de infecção associada aos genótipos de HPV – 31, 33, 45, 52 e 58. Como também é uma vacina profiláctica a prevenção não é eficaz em pessoas que já se encontrem infectadas com o HPV. [60]

São utilizados adjuvantes para aumentar a imunogenicidade das vacinas e a sua preferência é baseada principalmente na estabilidade, baixo custo e resposta imune adequada.

Para a eficácia da imunização, a vacinação deve ser realizada antes de ambos os sexos iniciarem relações de contacto sexual, o que gera na maioria dos continentes uma controvérsia ética, devido à idade em que é recomendada a vacina. [2]

As principais razões porque algumas pessoas se mostram contra a administração da vacina convergem na falta de conhecimento, ou seja, por pensarem que não há necessidade de prevenção. Também existem outros contras, como a preocupação com a sua segurança devido a efeitos secundários que podem surgir ou ainda porque os filhos não são sexualmente activos. [62] Para evitar estas decisões erradas devem ser publicados estudos regionais sobre a eficácia da vacinação. Os profissionais de saúde têm o dever de consciencializar os utentes para a sua importância.

2. Guidelines

A OMS (Organização Mundial de Saúde) recomenda a vacinação em raparigas entre os 9 e os 13 anos. [41] Antes de se iniciar o plano de vacinação deve ser confirmada a existência de infecções provocadas pelo HPV ou pelo HIV. [47]

Cervarix® e Gardasil® devem ser administradas a raparigas nos 11-12 anos e nos rapazes aos 9 anos. [47]

Gardasil 9® deve ser administrada nos rapazes entre os 9 e os 15 anos. Nas mulheres entre os 9 e os 26 anos. [47]

Todas as vacinas são administradas em três doses, com intervalo de seis meses entre cada uma (não deve ser excedido o intervalo de 12 a 15 meses entre a 1ª e a 2ª dose). [15] É ideal que o mesmo produto seja repartido na série de vacinação. [14]

Mulheres não vacinadas ou com vacinação incompleta devem receber a vacina. Nos EUA as vacinas não estão recomendadas / licenciadas para mulheres com mais de 26 anos. [47] Para quem não obteve a vacinação esta deve ser efectuada aos 26 nas mulheres e aos 21 nos homens. [29]

3. Informações Complementares

Não existe tratamento para o vírus, apenas são tratados os problemas que surgem devido ao HPV. [35] O tratamento dirigido às lesões que provocam verrugas genitais apenas serve para melhorar a sintomatologia. Em alguns casos pode ser feita a remoção da verruga. Caso as verrugas se encontrem em zonas húmidas ou intertiginosas há uma melhor resposta ao tratamento. Para a maioria dos casos a eficácia dá-se após 3 meses. [41]

Os métodos de tratamento de lesões pré-cancro englobam a crioterapia, a excisão electrocirúrgica em laço (LEEP) e a conização de faca fria (CKC). Na crioterapia é utilizado um disco metálico congelado que é aplicado no colo do útero que leva à congelação / destruição das lesões pré-cancerosas. LEEP permite a remoção das áreas anormais do colo do útero e da zona de transformação epitelial pela utilização de um laço fino que é alimentado por uma unidade electrocirúrgica. Este método permite o corte e coagulação simultâneo. CKC faz a remoção de uma área em forma de cone que inclui porções externas e internas do colo do útero (ecto e endocérvix). A quantidade de tecido a remover depende do tamanho da lesão e da sua probabilidade de transformação em cancro invasivo. [41]

Vesikari, Brodzki, van Damme, & Diez-Domingo (2015), demonstram que a vacina Gardasil-9® apenas em duas doses induz anticorpos aceitáveis, e não inferiores quando comparada com as três doses, em raparigas entre os 9 e 13 anos e portanto pode ser efectuado o plano de vacinação apenas com duas doses. [60]

Rousseau, et al., afirmam que há competição pela colonização do epitélio cervical por diferentes genótipos de HPV. Esta situação gera problemas com a vacinação, pois ao prevenir alguns tipos, outros associados podem aumentar a prevalência e voltar a causar infecção cervical. [50]

Como auxiliares de diagnóstico e prognóstico da infecção causada pelo HPV possuímos biomarcadores e oncomarcadores. Biomarcadores são marcadores biológicos que podem ser medidos experimentalmente e são indicativos de alterações patológicas. Podem ser realizados para diagnóstico de patologia ou para prognóstico de doença. Geralmente são utilizados marcadores bioquímicos que são obtidos através dos fluídos corporais. Os biomarcadores preditivos de neoplasia pré-invasiva cervical escamosa e glandular são p16INK4a, CDC6 e MCM5. O p16INK4a está estritamente relacionado com a infecção de HPV de alto risco. CDC6 associa-se à lesão invasiva de alto grau da cérvix. [30] A sobreexpressão da proteína E7, aumenta a expressão do inibidor da quinase dependente da ciclina - p16INK4a, daí ser um bom biomarcador para as células epiteliais transformadas pelo HPV. [62]

Oncomarcadores são marcadores tumorais que podem ser encontrados e quantificados em amostras biológicas tais como urina, sangue ou tecidos biológicos. Quando apresentam valores anormais, estes marcadores são indicativos de existência de cancro. Em relação aos oncomarcadores, CA125 está aumentado nos pacientes que apresentem adenocarcinoma cervical e este resultado está também associado ao estado de avanço tumoral, ao aumento de dimensão e envolvimento dos nódulos linfáticos. O anti-CD43, proposto por Vieira *et al.* pode avaliar a angiogénese do cancro cervical pois está associado à diferenciação das células endoteliais. [30]

DESAFIOS FUTUROS

É importante que se desenvolva uma vacina estável e rentável, ou seja, possível de ser comercializada em países que enfrentam situações precárias, uma vez que é nestas regiões que a maior percentagem de mortes devido ao cancro cervical ocorre. Nesta situação é importante não só conseguir uma vacina que possa ser facilmente distribuída, mas também criar recursos e infra-estruturas que facilitem o diagnóstico atempado de lesões intraepiteliais. [35]

1. Clínica

As nanopartículas têm potencial para serem utilizadas como vacina, uma vez que permitem apresentar repetidamente o antígeno que é escolhido para a sua formação, aumentando a eficácia da imunização. Estas resultam de self-assembly, ou seja, da “auto-montagem” de proteínas através de dois domínios de oligomerização. Podem ser lipídicas, proteicas, metálicas e poliméricas. [42] [55] [64]

As nanopartículas lipídicas são as mais vantajosas terapeuticamente, uma vez que têm maior compatibilidade biológica, estabilidade, protecção e baixa toxicidade. Existem dois tipos de geração de nanopartículas lipídicas. A primeira geração engloba as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN – solid lipid nanoparticle) e a segunda geração engloba os vectores lipídicos nanoestruturados (NLC – nanostructured lipid carriers). [52] Podemos encontrar aqui um novo avanço no desenvolvimento de novas vacinas contra o HPV.

Pode ser utilizada a vacinação de reforço com TA-CIN. Esta é uma proteína de fusão constituída pelas proteínas E6, E7 e L2 do HPV – 16. Este tipo de vacinação forma um agregado de antígeno filtrável e apresenta potencial como vacina preventiva. Pode ser utilizada nos casos de infecção persistente, de neoplasia intraepitelial de alto grau ou no cancro cervical. Ao ser administrada por via intradérmica, perto da lesão, aumenta o estímulo dos linfócitos T que se encontram no local da infecção e aumenta o reconhecimento e o processamento das APC. [44]

Relativamente às vias de vacinação, uma proposta para as áreas sub-desenvolvidas e sem acesso à terapêutica seria a vacina nasal ou oral. Este tipo de administração deve ser testado para que se possa integrar num programa vacinal. Gersch et al. (2012), concluíram que a administração da vacina VLP por via nasal induz elevados títulos de anticorpos. [15]

2. Diagnóstico

O processo anormal de metilação pode ser utilizado na detecção de novos biomarcadores do cancro cervical. No estudo de McCormick et al. (2015), é demonstrado que a metilação de Rb1 (gene do retinoblastoma 1) ocorre em amostras que apresentam alterações patológicas quando há a co-infecção HPV/EBV. [33]

Sabe-se que a proteína celular SRSF1 (Serine/arginine-rich splicing factor 1) é sobreexpressa nas lesões cervicais de alto grau e no cancro do colo do útero. A sua transcrição é activada pelo gene E2. [26] Pode ser utilizada como um biomarcador no risco de desenvolver cancro cervical.

A proteína celular hnRNPA1 quando em níveis elevados inibe a expressão da proteína L1. Este processo leva ao aumento dos níveis de hnRNPA1 na camada inferior do epitélio cervical e diminuição dos níveis nas camadas superficiais. Pode ser utilizada como um biomarcador de progressão de carcinogénese. [26]

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, D. H., Wallace, M., Bennie, T., Abar, B., Meiring, T. L., & al, e. (2016). Cumulative Impact of HIV and Multiple Concurrent Human Papillomavirus Infections on the Risk of Cervical Dysplasia. *Advances in Virology*, 5.
2. Bakir, A. H., & Skarzynski, M. (2015). Health Disparities in the Immunoprevention of Human Papillomavirus Infection and Associated Malignancies. *Frontiers in public health*, 256.
3. Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, X., Ferrer, E., & al, e. (2010). Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 1789-1799.
4. Castillo, A., Wang, L., Koriyama, C., & al., e. (2014). A systems biology analysis of the changes in gene expression via silencing of HPV-18 E1 expression in HeLa cells. *Open biology*, 130119-.
5. Choi, Y. J., & Park, J. S. (2016). Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *Journal of gynecologic oncology*, e21.
6. Costa, C. (2015). *Conhecimentos sobre o Papiloma Humano e cancro do colo do útero, numa amostra de alunos do ensino superior*. Bragança.
7. Diagnostics, Q. (10 de Fevereiro de 2017). *mRNA and Cervical Disease*. Obtido de <http://www.aptimaforher.com>
8. DiMaio, D. M. (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, 7866-7873.
9. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J. (2015). Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*, 3864-3880.
10. Fahey, L. M. (2009). A major role for the minor capsid protein of human papillomavirus type 16 in immune escape. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 6151-6.
11. Feller, L., Wood, N. H., Khammissa, R. A., & Lemmer, J. (2016). Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal

- squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell. *Head & face medicine*, 15.
12. Figueiredo, L. (2014). *Vacinas, novas perspectivas*. Universidade Fernando Pessoa, Porto.
 13. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., & Skalka, A. M. (2008). *Principles of Virology, 3rd Edition, Volume I: Molecular Biology*. ASM Press.
 14. Gallagher, K. E., Kadokura, E., Eckert, L. O., Miyake, S., & al, e. (2016). Factors influencing completion of multi-dose vaccine schedules in adolescents: a systematic review. *BMC Public Health*, 172.
 15. Gersch, E. D., Gissmann, L., & Garcea, R. L. (2013). New Approaches to Prophylactic Human Papillomavirus Vaccines for Cervical Cancer Prevention. *Antivir Ther*, 1-10.
 16. Giorgi Rossi, P., Benevolo, M., Vocaturo, A., Caraceni, D., & Ciccocioppo, L. (2013). Prognostic Value of HPV E6/E7 mRNA Assay in Women with Negative Colposcopy or CIN1 Histology Result: A Follow-Up Study. *PLoS ONE*, 4-11.
 17. Hasan, U. (2014). Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9. *Oncoimmunology*, e27257.
 18. Hindmarsh, P. L. (2007). Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virology journal*, 19.
 19. Howell-Jones, R., Soldan, K., Wetten, S., Mesher, D., & al, e. (2013). Declining genital warts in young women in England associated with HPV 16/18 vaccination: An ecological study. *Journal of Infectious Diseases*, 1397-1403.
 20. *Human Papillomaviruses in cervical cancer*. (24 de Novembro de 2016). Obtido de <http://win.eurocytology.eu/static/EUROCYTOLOGY/TUR/cervical/LP1ContentMcontentA1.html> .
 21. incellDx. (10 de Fevereiro de 2017). *HPV oncoTec E6, E7 mRNA Kit*. Obtido de https://incelldx.com/incelldx-content/uploads/400101Text_02-Brochure-HPV-OncoTect-E6-E7-mRNA1.pdf

22. J. Carter, L. K. (1996). The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *The Journal of infectious diseases*, 927-936.
23. J. den Boon, D. P. (2015). Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, E3255-E3264.
24. J. Silva, J. R. (2011). Oncogenic HPV types infection in adolescents and university women from North Portugal: From self-sampling to cancer prevention. *Journal of Oncology*, 8.
25. Joura, E. a., Giuliano, A. R., Iversen, O.-E., Bouchard, C., & al, e. (2015). A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *The New England journal of medicine*, 711-23.
26. Kajitani, N., & Schwartz, S. (2015). RNA Binding Proteins that Control Human Papillomavirus Gene Expression. *Biomolecules*, 758-774.
27. Klymenko, T., & Graham, S. V. (2012). Human papillomavirus gene expression is controlled by host cell splicing factors. *Biochemical Society transactions*, 773-7.
28. Koss, L. G., & Durfee, G. R. (1956). Unusual Patterns of Squamous Epithelium of the Uterine Cervix: Cytologic and Pathologic Study of Koilocytotic Atypia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1245-1261.
29. L. Markowitz, G. L. (2016). Prevalence of HPV After Introduction of the Vaccination Program in the United States. *Pediatrics*, 1-9.
30. Lazarenko, L. M., Nikitina, O. E., Nikitin, E. V., Demchenko, O. M., & al., e. (2014). Development of biomarker panel to predict, prevent and create treatments tailored to the persons with human papillomavirus-induced cervical precancerous lesions. *The EPMA journal*, 1.
31. Leto, M. D., Santos Júnior, G. F., Porro, A. M., & Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais brasileiros de dermatologia*, 306-317.

32. Li, X., Li, M., Yang, Y., & al, e. (2016). Anal HPV/HIV co-infection among Men Who Have Sex with Men: a cross-sectional survey from three cities in China. *Scientific Reports*, 21368.
33. McCormick, T. M., Canedo, N. H., Furtado, Y. L., Silveira, F. A., & al, e. (2015). Association between human papillomavirus and Epstein - Barr virus DNA and gene promoter methylation of RB1 and CDH1 in the cervical lesions: a transversal study. *Diagnostic pathology*, 59.
34. Mendez, F., Munoz, N., Posso, H., Molano, M., & al., e. (2005). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *The Journal of infectious diseases*, 1158-65.
35. Monie, A., Hung, C.-F., Roden, R., & Wu, T.-C. (2008). Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics : targets & therapy*, 97-105.
36. Nam, K., Chung, S., Kim, J., Jeon, S., & Bae, D. (2009). Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *Journal of Gynecologic Oncology*, 91-95.
37. NHI. (22 de Fevereiro de 2017). *HIV infection connected to rising anal cancer rates in men in the U.S.* Obtido de <https://www.cancer.gov/news-events/press-releases/2012/HIVwithAnalCancer>
38. Nogueira, R. L. (2016). *Efeito da variabilidade genética de HPV nos aspectos clínicos da papilomatose respiratória recorrente*. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo.
39. Odone, A., Visciarelli, S., Lalic, T., & al, e. (2015). Human papillomavirus-associated cancers : a survey on otorhinolaryngologists ' knowledge and attitudes on prevention. *ACTA otorhinolaryngologica italica*, 379-385.
40. Ohgi, K. A., Hunter, T., Pillus, L., & Rosenfeld, M. G. (2015). Knowledge of HPV among HIV-Infected and HIV-Uninfected Adolescent Women in South Africa. *Journal Womens Health Issues Care*, 267-271.

41. Organization, W. H. (2014). *Comprehensive Cervical Cancer Control - A guide to essential practice 2nd ed.* Obtido de [http://www.who.int:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144785/1/9789241548953_eng.pdf?ua=1](http://www.who.int:80/http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144785/1/9789241548953_eng.pdf?ua=1)
42. Padilla, J. E., Colovos, C., & Yeates, T. O. (2001). Nanohedra: using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals, and filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2217-2221.
43. Paul, K. T. (2016). 'Saving lives': Adapting and adopting Human Papilloma Virus (HPV) vaccination in Austria. *Social Science and Medicine*, 193-200.
44. Peng, S., Qiu, J., Yang, A., & al, e. (2016). Optimization of heterologous DNA-prime, protein boost regimens and site of vaccination to enhance therapeutic immunity against human papillomavirus-associated disease. *Cell & Bioscience*, 16.
45. Petry, K. U. (2014). HPV and cervical cancer. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 59-62.
46. Pinto, L. A., Edwards, J., Castle, P. E., & al., C. D. (2003). Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 in Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles. *The Journal of Infectious Diseases*, 327-38.
47. Prevention, C. f. (22 de Fevereiro de 2017). *Cervical Cancer Screening for Women Who Attend STD Clinics or Have a History of STDs.* Obtido de <https://www.cdc.gov/std/treatment/2010/cc-screening.htm>
48. Rivera-Acosta, J. E., Aponte, M., Villamil, I., Romaguera, J., & al., e. (2016). Human Papilloma Virus Awareness Among Hispanic Females with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Racial and Ethnic Health Disparities*, 55-62.
49. Rodriguez-Cerdeira, C. S.-B. (2012). Evaluation of Association between Vaginal Infections and High-Risk Human Papillomavirus Types in Female Sex Workers in Spain. *ISRN obstetrics and gynecology*, 240190.
50. Rousseau, M. C., Pereira, J. S., Prado, J. C., Villa, L. L., Rohan, T. E., & al., e. (2001). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of

- acquisition and persistence of HPV infection. *The Journal of infectious diseases*, 1508-1517.
51. S. Pyeon, S. P. (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathogens*, 1-9.
 52. Sagasetta, J. L., Malito, E., Rappuoli, R., & Bottomley, M. J. (2015). Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 58-68.
 53. Schwartz, S. (2013). Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, 187-196.
 54. Sharma, M., Ortendahl, J., van der Ham, E., Sy, S., & Kim, J. J. (2012). Cost-effectiveness of human papillomavirus vaccination and cervical cancer screening in Thailand. *BJOG*, 166-76.
 55. Silva, B. (2015). *Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos*. Universidade Fernando Pessoa, Porto.
 56. Sinogas, C. (2011/2012). *Virologia*. Universidade de Évora.
 57. T. Wright, M. S. (2011). Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *American Journal of Clinical Pathology*, 578-586.
 58. Tiina Petaäja, M. H. (2009). Immunogenicity and Safety of Human Papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-Adjuvanted Vaccine in Healthy Boys Aged 10-18 Years. *Journal of Adolescent Health*, 33-40.
 59. U. Hasan, E. B. (2007). TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 3186-3197.
 60. Vesikari, T., Brodzki, N., van Damme, P., & Diez-Domingo, J. e. (2015). A Randomized, Double-Blind, Phase III Study of the Immunogenicity and Safety of a 9-Valent Human Papillomavirus L1 Virus-Like Particle Vaccine (V503) Versus Gardasil® in 9-15-Year-Old Girls. *The Pediatric infectious disease journal*, 992-8.

61. Viens, L. J., Henley, J., Watson, M., Markowitz, L. E., & Thomas, C. C. (8 de Julho de 2016). *Centers of Disease Control and Prevention*. Obtido de www.cdc.gov: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6526a1.htm>
62. White, M. D. (2014). Pros , cons , and ethics of HPV vaccine in teens — Why such controversy ? *Transl Andro Urol*, 429-434.
63. Y. Yue, H. Y. (2013). Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. *PLoS ONE*, 1-12.
64. Yang, Y., Neef, T., Mittelholzer, C., Garcia Garayoa, E., & Bläuenstein, P. (2013). The biodistribution of self-assembling protein nanoparticles shows they are promising vaccine platforms. *Journal of nanobiotechnology*, 36.
65. Youssef, M. A., Abdelsalam, L., Harfoush, R. A., & al, e. (2016). Prevalence of human papilloma virus (HPV) and its genotypes in cervical specimens of Egyptian women by linear array HPV genotyping test. *Infectious Agents and Cancer*, 6.
66. Zehbe, I., Lichtig, H., Westerback, A., Lambert, P. F., & Tommasino, M. (2011). Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. *Molecular cancer*, 77.