

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**A BIOQUÍMICA CLÍNICA NO ACOMPANHAMENTO
DA GRÁVIDA: FUNÇÃO HEPÁTICA E PATOLOGIAS
ASSOCIADAS**

Raquel Lauret Duarte Amaro

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora
Maria João Monteiro dos Santos Ferreira da Silva e
coorientado pela Dr.^a Maria da Conceição Esperança
Faustino Monteiro Barreira

Mestrado em Análises Clínicas

2024

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**A BIOQUÍMICA CLÍNICA NO ACOMPANHAMENTO
DA GRÁVIDA: FUNÇÃO HEPÁTICA E PATOLOGIAS
ASSOCIADAS**

Raquel Lauret Duarte Amaro

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora
Maria João Monteiro dos Santos Ferreira da Silva e
coorientado pela Dr.^a Maria da Conceição Esperança
Faustino Monteiro Barreira

Mestrado em Análises Clínicas

2024

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha orientadora, a Professora Doutora Maria João, pela sua inteira disponibilidade e ajuda na elaboração do presente relatório.

Agradecer também à Dr.^a Conceição Faustino pela colaboração durante o estágio e preparação do relatório, bem como a toda a equipa do Laboratório Fernanda Galo pela receção e aprendizagem ao longo dos meses onde o contacto diário constituiu uma experiência muito enriquecedora.

Por fim, um especial agradecimento a todos os meus familiares e amigos que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha formação académica.

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

O presente documento divide-se em duas partes: o relatório de estágio (Parte I) e a monografia (Parte II).

O relatório refere-se ao estágio curricular do 2º semestre do 2º ano do Mestrado de Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, tendo decorrido no Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo, em Tomar. São descritos os equipamentos e respetivas metodologias, a forma como é realizado o controlo de qualidade e algumas das interferências possíveis nas áreas pré-analítica, bioquímica, hematologia e imunologia.

A monografia está inserida na área da Bioquímica, dando relevância à mulher grávida e às alterações fisiológicas que esta apresenta, com foco na função hepática. São abordados temas como etiologia, diagnóstico através de manifestações clínicas e achados laboratoriais, bem como complicações e tratamento de duas patologias exclusivas da gravidez: colestase intra-hepática e síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, plaquetas baixas).

Palavras-chave: Bioquímica; Hematologia; Imunologia; Gravidez; Função hepática

Abstract

This document is divided into two parts: the internship report (Part I) and the monograph (Part II).

The report refers to the curricular internship of the 2nd semester of the 2nd year of the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon, which took place at the Fernanda Galo Clinical Analysis Laboratory in Tomar. The equipment and respective methodologies are described, as well as how quality control is carried out and some of the possible interferences in the pre-analytical, biochemistry, hematology and immunology areas.

The monograph is inserted in the area of Biochemistry, giving relevance to pregnant women and the physiological changes they present, with a focus on liver function. Topics such as etiology, diagnosis through clinical manifestations and laboratory findings, as well as complications and treatment of two pathologies exclusive to pregnancy are covered: intrahepatic cholestasis and HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets).

Key-words: Biochemistry; Hematology; Immunology; Pregnancy; Liver function

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ABREVIATURAS.....	XI
PARTE I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO	1
INTRODUÇÃO	2
DESENVOLVIMENTO.....	3
A. FASE PRÉ-ANALÍTICA	4
A.1. PREPARAÇÃO DO UTENTE	4
A.2. COLHEITA DE AMOSTRAS.....	5
A.2.1. <i>De sangue.....</i>	5
A.2.2. <i>De expetoração.....</i>	6
A.2.3. <i>Urina.....</i>	7
A.2.4. <i>Exsudados nasais.....</i>	7
A.2.5. <i>Exsudados faríngeos.....</i>	7
A.2.6. <i>Exsudado auricular (otites externas).....</i>	7
A.2.7. <i>Exsudados vaginais.....</i>	7
A.2.8. <i>Exsudado uretral.....</i>	7
A.2.9. <i>Exsudados de abcessos.....</i>	8
A.2.10. <i>Micológicas.....</i>	8
A.2.11. <i>Esperma.....</i>	8
A.2.12. <i>Fezes.....</i>	8
A.3. TRANSPORTE DA AMOSTRA	9
A.4. TRATAMENTO DA AMOSTRA.....	9
A.4.1. <i>Pré-tratamento das amostras.....</i>	10
A.4.2. <i>Rejeição de amostras.....</i>	10
A.5. CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	11
A.6. ENVIO A SUBCONTRATADOS	11
A.7. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	12
B. BIOQUÍMICA.....	13
B.1. EQUIPAMENTO DXC 700 AU	13
B.1.1. <i>Métodos de determinação</i>	13
B.1.2. <i>Controlo de qualidade Interno (CQI).....</i>	14
B.1.3. <i>Calibração</i>	14
B.1.4. <i>Processamento da Amostra.....</i>	15
B.1.5. <i>Interferências nos resultados.....</i>	15

C. HEMATOLOGIA.....	16
C.1. HEMOGRAMA	16
C.1.1. <i>Equipamento Unicel DXH800</i>	17
C.1.2. <i>Controlo de Qualidade Interno (CQI)</i>	20
C.1.3. <i>Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)</i>	20
C.1.4. <i>Calibração</i>	20
C.1.5. <i>Processamento da Amostra</i>	21
C.1.6. <i>Valores de Referência</i>	21
C.1.7. <i>Interferências nos resultados</i>	23
C.1.8. <i>Execução de esfregaços sanguíneos para observação ao microscópio</i>	23
C.2. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO (VS)	25
C.2.1. <i>Equipamento Ves matic 30</i>	25
C.2.2. <i>Método de Determinação</i>	26
C.2.3. <i>Controlo de qualidade interno (CQI)</i>	26
C.2.4. <i>Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)</i>	27
C.2.5. <i>Processamento da Amostra</i>	27
C.2.6. <i>Valores de Referência</i>	27
C.2.7. <i>Interferências nos resultados</i>	27
C.2.8. <i>Interpretação dos resultados</i>	28
C.3. HEMOGLOBINA GLICADA (HBA1C).....	28
C.3.1. <i>Equipamento ADAMS A1c HA-8180T</i>	28
C.3.2. <i>Métodos de determinação</i>	29
C.3.3. <i>Controlo de Qualidade Interno (CQI)</i>	29
C.3.4. <i>Processamento da amostra</i>	30
C.3.5. <i>Valores de referência</i>	30
C.3.6. <i>Interferência nos resultados</i>	30
C.3.7. <i>Interpretação dos resultados</i>	30
C.4. FATORES DE COAGULAÇÃO	31
C.4.1. <i>Equipamento Stago Compact Max</i>	31
C.4.2. <i>Método de Determinação</i>	31
C.4.3. <i>Tempo de Protrombina (TP)</i>	31
C.4.4. <i>Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)</i>	32
C.4.5. <i>Fibrinogénio</i>	33
C.4.6. <i>Controlo interno da qualidade (CQI)</i>	34
C.4.7. <i>Processamento da amostra</i>	34
C.5. GRUPOS SANGUÍNEOS E COOMBS.....	34
C.5.1. <i>Equipamento WaDiana Compact</i>	34
C.5.2. <i>Grupos Sanguíneos</i>	35

C.5.3. Coombs - Anti-globulina Direta e Indireta	37
D. IMUNOLOGIA	39
D.1. AUTOIMUNIDADE	39
D.1.1. Reumatologia.....	39
D.1.2. Gastroenterologia	40
D.2. AUTOIMUNIDADE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI).....	41
D.3. IMUNOENSAIOS	42
D.3.1. Equipamento Architect i2000SR.....	42
D.3.2. Equipamento Unicel DXI 800.....	51
D.3.3. Controlo de Qualidade Interno (CQI).....	54
D.3.4. Calibração.....	55
D.3.5. Processamento da Amostra.....	55
D.3.6. Interferências.....	55
CONTROLO DE QUALIDADE	56
CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO (CQI).....	56
AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE (AEQ).....	57
PARTE II: MONOGRAFIA	58
INTRODUÇÃO	59
A. A MULHER GRÁVIDA.....	60
A.1. EXAMES E TESTES LABORATORIAIS.....	60
A.2. DESENVOLVIMENTO DA GRAVIDEZ	61
A.3. PLACENTA.....	62
A.4. ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS GERAIS	63
A.4.1. Hematopoiese.....	63
A.4.2. Hemostase.....	63
A.4.3. Função renal.....	64
B. FUNÇÃO HEPÁTICA	65
B.1. ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO HEPÁTICA.....	65
B.2. DOENÇAS HEPÁTICAS ESPECÍFICAS DA GRAVIDEZ.....	66
B.2.1. Colestase intra-hepática da gravidez (ICP)	67
B.2.2. Síndrome HELLP(hemólise,enzimas hepáticas aumentadas,plaquetas baixas)74	
CONCLUSÃO	81
BIBLIOGRAFIA	82

Índice de Figuras

Figura 1 - Fluxograma de trabalho do LFG	12
Figura 2 - Equipamento Beckman Coulter – DXC 700 AU	13
Figura 3 - Equipamento Beckman Coulter - Unicel DXH 800	17
Figura 4 - Equipamento Ves matic 30	25
Figura 5 - Equipamento ADAMS A1c HA-8180T	29
Figura 6 - Exemplos de fatores que influenciam a determinação da HbA1c	30
Figura 7 - Equipamento STA Compact Max.....	31
Figura 8 - Equipamento WaDiana Compact.....	35
Figura 9 - Imunoensaio ANA-LIA-XL.....	40
Figura 10 - Imunoensaio Gastro-LIA	41
Figura 11 - Equipamento Architect i2000 SR.....	42
Figura 12 - Equipamento Unicel DXI 800 da Beckman Coulter	51
Figura 13 - Exames laboratoriais que devem ser realizados ao longo da gestação	60
Figura 14 - Alterações da coagulação na gravidez.....	64
Figura 15 - Esquema da fisiopatologia da síndrome HELLP	76
Figura 16 - Sistemas de classificação da síndrome HELLP: Tennessee e Mississippi.....	78

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Pré-tratamento das amostras.....	10
Tabela 2 - Armazenamento prévio das amostras	11
Tabela 3 – Determinações efetuadas no hemograma completo	16
Tabela 4 – Determinações para quantificação dos reticulócitos no sangue periférico.....	17
Tabela 5- Métodos de determinação com base no manual do DXH 800	18
Tabela 6 - Valores de referência dos adultos de acordo com os sexos.	22
Tabela 7 – Valores de referência para não adultos.	22
Tabela 8 - Interferências nos resultados de hemograma.....	23
Tabela 9 - Apresentação de evidências para a execução de esfregaços sanguíneos.....	23
Tabela 10 - Apresentação dos resultados dos grupos sanguíneos.....	36
Tabela 11 - Marcadores tumorais pesquisados no equipamento Architect i2000SR	43
Tabela 12 - Constituição dos reagentes para detecção de anticorpos IgM e IgG do HAV	44
Tabela 13 - Constituição dos reagentes para detecção de anticorpos IgM e IgG do vírus da rubéola..	47
Tabela 14 - Constituição dos reagentes para detecção de anticorpos IgM e IgG contra Toxoplasma gondii	49
Tabela 15 - Constituição dos reagentes para detecção de anticorpos IgM e IgG contra o CMV.....	50

Abreviaturas

Ac: Anticorpo

ADLC: Automated Differential Leucocyte Count (*Contagem diferencial automatizada de leucócitos*)

AEQ: Avaliação Externa da Qualidade

AFLP: Acute Fatty Liver of Pregnancy (*Esteatose aguda da gravidez*)

AFP: Alfa-Fetoproteína

Ag: Antígeno

ALP: Alkaline Phosphatase (*Fosfatase alcalina*)

ALT: Alanina aminotransferase

ANA: Anticorpos Antinucleares

Anti-HBe: Anticorpos contra o antígeno e da hepatite B

anti-CEA: Anticorpos contra o antígeno carcinoembrionário

anti-CMV: Anticorpos contra o citomegalovírus

Anti-HBc: Anticorpos contra o antígeno core da hepatite B

Anti-HBs: Anticorpos contra o antígeno de superfície da hepatite B

Anti-HCV: Anticorpos contra o vírus da Hepatite C

anti-PSA: Anticorpos contra o antígeno específico da próstata

ARN: Ácido Ribonucleico

ASCA: Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (*Anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae*)

ASO: Anti-estreptolisina O

AST: Aspartato aminotransferase

ATG: Anticorpo anti-tiroglobulina

ATPO: Anticorpo anti-tiroperoxidase

BSEP: Bile Salt Export Pump (*Bomba de exportação de sais biliares*)

CAR: Recetor Constitutivo de Androstano

CEA: Carcinoembryonic Antigen (*Antígeno carcinoembrionário*)

CHGM: Concentração de Hemoglobina Globular Média

CID: Coagulação Intravascular Disseminada

CK: Creatinaquinase

CMIA: Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (*Imunoensaio quimioluminescente de micropartículas*)

CMV: Citomegalovírus

CQI: Controlo de Qualidade Interno

CYP7A1: Cholesterol 7 alpha-hydroxylase (*Colesterol 7 alfa-hidroxilase*)

DGS: Direção Geral de Saúde

DNA: Deoxyribonucleic acid (*Ácido desoxirribonucleico*)

EASL: European Association for the Study of the Liver (*Associação europeia para o estudo do fígado*)

EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid (*Ácido etilendiamino tetra-acético*)

FBC: Full Blood Count (*Hemograma completo*)

FR: Fator Reumatoide

FVL: Factor V Leiden (*Fator de coagulação V Leiden*)

FXR: Farnesoid X Receptor (*Recetor farnesóide X*)

GB: Glóbulos Brancos

GGT: Gamaglutamiltransferase

GSTa: Glutathione S Transferase alfa
GV: Glóbulos Vermelhos
HAV: Hepatitis A Virus (*Vírus da hepatite A*)
HAVAc-IgM e IgG: Anticorpos IgM e IgG contra o vírus da hepatite A
Hb: Hemoglobina
HbA1c: Hemoglobina glicada
HBeA: Antígeno e da hepatite B
HBsAg: Antígeno de superfície da hepatite B
HBV: Hepatitis B Virus (*Vírus da hepatite B*)
hCG: Human Chorionic Gonadotropin (*Gonadotrofina coriônica humana*)
Hct: Hematócrito
HCV: Hepatitis C Virus (*Vírus da hepatite C*)
HDL: High Density Lipoprotein (*Lipoproteína de alta densidade*)
HELLP: Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets (*Hemólise, enzimas hepáticas elevadas, plaquetas baixas*)
HEp-2: Human Epithelial Type 2 (*Células epiteliais humanas tipo 2*)
HGM: Hemoglobina Globular Média
HIV: Human Immunodeficiency Virus (*Vírus da imunodeficiência humana*)
HNF: Heparina Não Fracionada
hPL: Human Placental Lactogen (*Hormona lactogénica-placentária humana*)
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (*Cromatografia líquida de alta eficiência*)
HRP: Horseadish Peroxidase (*Peroxidase de rábano*)
HTA: Hipertensão arterial
ICP: Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy (*Colestase intrahepática da gravidez*)
IF: Imunofluorescência Indireta
Ig: Imunoglobulina
INR: International Normalized Ratio (*Relação internacional normalizada*)
INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IRF: Immature Reticulocyte Fraction (*Fração imatura de reticulócitos*)
ISI: International Sensitivity Index (*Índice de sensibilidade internacional*)
LDH: Lactato Desidrogenase
LDL: Low Density Lipoprotein (*Lipoproteína de baixa densidade*)
LES: Lúpus Eritematoso Sistémico
LFG: Laboratório Fernanda Galo
LIA: Line Immunoassay (*Imunoensaio em linha*)
MAHA: Microangiopathic Hemolytic Anemia (*Anemia hemolítica microangiopática*)
MCTD: Mixed Connective Tissue Disease (*Doença mista do tecido conjuntivo*)
MDR3: Multidrug resistance protein 3 (*Proteína de transporte de resistência a múltiplas drogas 3*)
MPV: Mean Platelet Volume (*Volume médio das plaquetas*)
NaTCP: Sodium-dependent Taurocholate Cotransport Polypeptides (*Polipeptídeos de cotransporte de taurocolato dependente de sódio*)
PBC: Primary Biliary Cholangitis (*Colangite biliar primária*)
PCA: Parietal Cell Antibodies (*Anticorpos anti-célula parietal*)
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen (*Antígeno nuclear celular em proliferação*)
PCR: Proteína C Reativa

Plq: Plaquetas
PSA: Prostate Specific Antigen (*Antigénio específico da próstata*)
PTGO: Prova de Tolerância à Glucose Oral
PTT: Púrpura Trombocitopénica Trombótica
PXR: Pregnane X Receptor (*Recetor pregnano X*)
RDW: Red Cell Distribution Width (*Distribuição de glóbulos vermelhos*)
RBC: Red Blood Cells (*Glóbulos vermelhos*)
Ret: Reticulócitos
RLU: Relative Light Units (*Unidades relativas de luz*)
Rpm: Rotações por minuto
SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (*Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2*)
SHU: Síndrome Hemolítica Urémica
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Ssc: Esclerose sistémica
TJP2: Tight Junction Protein 2 (*Proteína de junção estreita*)
TP: Tempo de Protrombina
TRG: Triglicéridos
TRL: Toll-like Receptor (*Recetores do tipo Toll*)
tTg: Tissue Transglutaminase (*Transglutaminase tecidual*)
TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
UDCA: Ursodeoxycholic Acid (*Ácido ursodesoxicólico*)
UK NEQAS: United Kingdom National External Quality Assessment Service (*Serviço nacional de avaliação de qualidade externa do Reino Unido*)
UCIN: Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais
VCS: Volume, High frequency conductivity, Scatter (*Volume, condutividade de alta frequência, dispersão*)
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (*Fator de crescimento endotelial vascular*)
VGM: Volume Globular Médio
VS: Velocidade de Sedimentação
VWF: Von Willebrand factor (*Fator Von Willebrand*)

PARTE I

Relatório de estágio

Introdução

O estágio curricular, realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, teve lugar no Laboratório Fernanda Galo (LFG), com instalações na rua Coronel Garcês Teixeira, nº15, Tomar. O estágio foi efetuado em quatro áreas distintas: A - Pré-analítica, B - Bioquímica, C - Hematologia e D - Imunologia e teve uma duração de 750 horas, tendo decorrido entre o mês de março e setembro de 2023, sob a orientação da Doutora Maria da Conceição Esperança Faustino Monteiro Barreira, especialista em Análises Clínicas pela ordem dos Farmacêuticos e Diretora Técnica dos Laboratórios Fernanda Galo, desde 1993.

Neste relatório serão abordadas cada uma das quatro áreas referidas, sendo que, relativamente à área da Bioquímica, será feita uma referência muito breve, devido ao facto de o tema da monografia estar inserido nesta área. Serão mencionados os equipamentos utilizados, os métodos de determinação e os parâmetros analisados, o controlo de qualidade interno (CQI), a avaliação externa da qualidade (AEQ), o processamento das amostras, os valores de referência, a interpretação dos resultados e algumas possíveis interferências nos mesmos. Devido à vasta quantidade de parâmetros analisados no laboratório nas diversas áreas, apenas serão referidos os mais solicitados e com maior relevância.

Desenvolvimento

No presente relatório de estágio serão abordadas quatro áreas distintas:

A - Pré-analítica

B - Bioquímica

C - Hematologia

D - Imunologia

Por uma questão de facilidade de leitura do trabalho, adota-se este item global que se designa por “Desenvolvimento” para, dentro dele, se explicitarem os aspetos mais relevantes de cada uma das quatro áreas identificadas.

A. Fase pré-analítica

A fase pré-analítica inclui a preparação do doente, a obtenção da amostra e o tratamento e conservação da mesma. Numerosos fatores e variações podem advir desta fase, podendo levar à alteração dos resultados e, conseqüentemente, a uma interpretação diversa. Estas variações dependem da análise considerada e deverão ser tidos em conta no procedimento de trabalho. Entre estes fatores incluem-se:

- **Fatores de variação ligados ao sujeito, devido a variações fisiológicas e fisiopatológicas:** idade, sexo, gravidez/amamentação, menopausa, peso, alimentação, stress, exercício físico, álcool, medicação, entre outros;
- **Fatores de variação dependentes da colheita do produto para análise:** tubos de colheita, tempo de garrote, aditivos (anticoagulantes, separadores, antiglicolíticos), agitação do tubo, medição do volume de urina (urina 24h), entre outros;
- **Fatores relacionados com o próprio analito:** verificação da conformidade ou não do produto colhido (volume insuficiente, más condições de transporte, defeito de identificação), centrifugação, aspeto do soro (hemolisado, icterico, turvo), entre outros.

Para que todos os colaboradores tenham conhecimentos acerca desta fase e com o objetivo de melhorar a segurança e a qualidade dos serviços prestados, nos postos de colheita e laboratórios Fernanda Galo está disponível o Manual de Colheitas (1), pelo que a informação mencionada daqui em diante sobre a fase pré-analítica foi retirada deste manual.

A.1. Preparação do utente

Primeiramente, o utente deve ser informado das condições de preparação, o que depende do tipo de análise/pedido:

- Sangue – o utente deve estar em jejum pelo menos durante 8 horas, a menos que o médico prescritor solicite o contrário (exemplo: urgências);
- Expetoração – o utente deve apenas fazer a higiene oral com água;
- Glicémia pós-prandial – o utente deve vir em jejum;
- Prova de tolerância á glucose oral (PTGO) – o utente deve vir em jejum e permanecer no laboratório durante o período da prova. O tempo deve ser gerido pelo técnico de análises;
- Uroculturas – o utente deve lavar os órgãos genitais com um toalhete fornecido pelo laboratório. Caso o utente esteja a fazer antibioterapia, esta análise apenas deve efetuada 10 dias após a última toma;
- Exsudados vaginais/uretrais – o utente deve lavar os órgãos genitais apenas com água e sabão, sem nenhum desinfetante pois pode alterar o resultado;

- Exsudado nasofaríngeo – o utente não se pode assoar, comer ou lavar os dentes na manhã da colheita;
- Espermograma/espermocultura – o utente deve estar num período de abstinência de 3 - 5 dias. Caso tenha ocorrido um episódio febril deve esperar 3 semanas para efetuar a colheita;
- Micológico (pele) – informar o paciente de não colocar nenhum agente terapêutico pelo menos 3 dias antes da colheita;
- PSA (Antigénio Específico da Próstata) livre e total – as amostras devem ser colhidas antes de intervenções na próstata tais como toque rectal, massagem da próstata, ultra-som transretal e biópsia da próstata. O toque rectal pode causar um aumento transitório nos níveis de PSA livre e total, por isso recomenda-se uma segunda medição do PSA total no caso de elevação excessiva dos níveis;
- Hormonas de reprodução - visto que os níveis destas hormonas em mulheres férteis são bastante variáveis consoante a fase do ciclo, é importante registar o dia em que foi feita a colheita.

A.2. Colheita de amostras

A colheita de amostras é um dos pontos fulcrais num laboratório de análises clínicas e que infelizmente, é onde existe uma grande parte dos erros. Como tal, é importante que o analista saiba exatamente como proceder em cada tipo de análise. É de salientar a importância da utilização do material de colheitas adaptado a cada pedido, não só para a preservação da amostra como para a correta determinação das análises.

De seguida, será mencionado como, de acordo com o manual de colheitas do LFG, se executam as colheitas:

A.2.1. De sangue

Caso a colheita seja efetuada no laboratório devem ser seguidos os seguintes pontos:

- a. Certificar que a sala de colheitas está devidamente limpa, assim como, verificar se o material necessário para a colheita está disponível e em boas condições;
- b. Instalar o utente numa posição confortável;
- c. Verificar o pedido médico;
- d. Preparar o material necessário, de acordo com o tipo de veia e de pedido e, etiquetar os tubos com os códigos de barra correspondentes. Existem vários tipos de tubos de colheita:

- sem anticoagulante, com ou sem gel - ativa a cascata da coagulação, obtém-se soro, usado sobretudo em bioquímica, endocrinologia e imunologia;
- com anticoagulante (EDTA de sódio ou potássio) - obtém-se sangue total, utilizado em técnicas moleculares e na hematologia, por exemplo, na execução de hemogramas, hemoglobina glicada, HLAB27;
- com citrato trissódico – após centrifugação, obtém-se plasma, utilizado na hematologia para análises aos fatores de coagulação;
- com heparina – obtém-se sangue total, utilizado por exemplo na gasometria.

Quando existem vários pedidos que exigem vários tipos de tubos é importante a ordem pela qual a colheita é feita de modo a evitar contaminações. Primeiro, a amostra é colocada em tubos sem anticoagulante, por exemplo, nas hemoculturas. De seguida, coloca-se nos tubos com gel separador e posteriormente nos tubos com anticoagulante de citrato de sódio e EDTA.

- e. Preparar o utente: procurar e escolher a melhor veia e o local a puncionar, colocar garrote, desinfetar a área com álcool ou outro desinfetante;
- f. Recolher o volume de sangue necessário;
- g. Tirar o garrote e colocar algodão ou gaze no local puncionado;
- h. Dividir a amostra para os diferentes tubos, no caso de a colheita ser com seringa tradicional (sistema aberto);
- i. Proteger adequadamente o local puncionado, de modo que o utente possa abandonar a sala de colheitas em boas condições;
- j. Registrar na folha de colheitas, toda a informação adicional que se ache necessário para melhorar a qualidade do serviço prestado (incidentes, medicação, anticoagulante, etc.). Para além disto, deve se registar a data, hora e nome do colaborador que procedeu á colheita.

Como o LFG executa domicílios, ou seja, envia pessoal qualificado a um local definido pelo cliente para colher as amostras, todos os pontos acima mencionados devem ser cumpridos. Neste caso, como não há uma sala de colheitas, deve-se garantir que o local onde é executada a colheita cumpre os requisitos mínimos de higiene.

A.2.2. De expetoração

O utente deve colher a primeira expetoração da manhã em jejum para um recipiente esterilizado, e no caso de a colheita ser executada num posto de colheitas e não no laboratório, refrigerar entre 4º e 8ºC se o tempo de transporte for superior a 2 horas.

A.2.3. Urina

Para a análise de urinas tipo II e uroculturas, o utente deve colher, preferencialmente, a primeira urina da manhã para um tubo/copo fornecido pelo laboratório, rejeitando o primeiro jato de urina. Caso não seja possível entregar logo no laboratório, a urina deve ser refrigerada e entregue na mesma manhã da colheita.

Para a colheita de urina de 24 horas, o utente deve descartar a primeira urina da manhã e anotar a hora desta primeira micção. A partir daqui, deve guardar todas as micções no recipiente dado pelo laboratório até à mesma hora anotada do dia seguinte.

A.2.4. Exsudados nasais

Introduzir uma zaragatoa por narina até aos seios perinasais e colher o produto através de movimentos rotatórios. Ambas as zaragatoas devem ser introduzidas no mesmo tudo de transporte e, de cada uma faz-se uma lâmina.

A.2.5. Exsudados faríngeos

Sem desinfeção local, passa-se duas zaragatoas sobre a superfície das amígdalas e de todas as superfícies de aspeto patológico, evitando tocar na mucosa bucal e na língua. Uma das zaragatoas destina-se à execução da lâmina e a outra para o meio de transporte.

A.2.6. Exsudado auricular (otites externas)

Ao nível da lesão, colher no canal auditivo duas zaragatoas. Uma das zaragatoas destina-se à execução da lâmina e a outra para o meio de transporte.

A.2.7. Exsudados vaginais

A amostra deve ser colhida com 2 zaragatoas na zona de maior exsudado ou do fundo do saco vaginal posterior. Uma das zaragatoas destina-se à execução do esfregaço, a realizar no ato da colheita e a outra deve ser colocada em meio de transporte à temperatura ambiente.

A.2.8. Exsudado uretral

Deve-se limpar qualquer exsudado previamente. De seguida, insere-se uma zaragatoa fina 2 a 4 cm na uretra e rodar. Repetir o processo com uma segunda zaragatoa, sendo que uma delas destina-se à execução do esfregaço, a realizar no ato da colheita e a outra deve ser colocada em meio de transporte à temperatura ambiente.

No caso de pesquisas especiais, tanto nos exsudados vaginais como uretrais, colher uma terceira zaragatoa que deve ser transportada em soro fisiológico estéril (para pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*) ou meio de transporte próprio (para pesquisa de *Mycoplasma/Ureaplasma*) à temperatura ambiente.

A.2.9. Exsudados de abscessos

Infeções superficiais (escaras)

Faz-se com a ajuda de uma zaragatoa sem desinfecção local. Colher com 2 zaragatoas: uma para fazer lâmina para coloração e a outra é utilizada para semear em meio de transporte. Se colhido num posto de colheitas, transportar o mais rapidamente possível para o laboratório.

Infeções profundas (abscessos)

Após desinfecção local, colher com a ajuda de uma seringa adequada ao tipo de abscesso, usando um meio de transporte adequado. Se colhido num posto de colheitas, transportar o mais rapidamente possível para o laboratório.

A.2.10. Micológicas

Pele

Depende do tipo de lesões da pele. Se forem lesões secas, colher escamas da pele infetada com uma espátula ou bisturi para uma caixa de petri. No caso de serem lesões húmidas, colher com uma zaragatoa e introduzir em meio de transporte. Se a colheita for feita num posto de colheitas, transportar o mais rapidamente possível para o laboratório.

Unhas

Deve-se cortar a parte inferior da unha ou cortar lamelas da unha parasitada.

A.2.11. Esperma

Para a colheita de esperma para espermograma/espermocultura, deve-se recolher a ejaculação para um recipiente esterilizado.

A.2.12. Fezes

Tanto para coprocultura como para exame parasitológico direto de fezes, o utente deve recolher uma amostra de fezes para um recipiente fornecido pelo laboratório. No caso de pesquisa de sangue oculto nas fezes, o utente deve recolher uma amostra por dia com referência à data de recolha. As amostras devem ser mantidas no frigorífico.

No entanto, existem restrições à colheita: não é permitido nas unidades de colheita, a obtenção de produtos biológicos destinados à análise cuja realização deve ser imediata ou cujo resultado possa sofrer alteração com o transporte para o laboratório, como é o caso, por exemplo, das provas hormonais (com estimulação). No caso de haver pedidos de analitos específicos, o técnico da unidade deve contactar o laboratório para que seja avaliada a sua viabilidade, receber as instruções e o parecer do diretor técnico.

A.3. Transporte da amostra

O transporte de amostras deve ser efetuado em malas térmicas, protegidas da luz e termoestabilizadas, por colaboradores do LFG em viatura própria do laboratório, para que as condições de transporte não interfiram na qualidade e representatividade dos ensaios/análises.

Quer o transporte de amostras dos postos de colheita para o laboratório (receção) e deste para laboratórios subcontratados (emissão) devem ser registados em documentos para o efeito, assim como todas as ocorrências relacionadas com o mesmo. Para além disso, as amostras são sempre acompanhadas das requisições de análises assim como as guias de transporte, o que permite verificar os dados do cliente, as análises requisitas e se o que chega ao destino coincide com o que está previsto.

A.4. Tratamento da amostra

Quando as amostras chegam ao laboratório, são enviadas para a triagem, onde os técnicos devem confirmar que a amostra se encontra bem identificada para que, em qualquer momento, se necessário, seja possível identificar o utente e a natureza da amostra. Esta verificação é possível através do código de barras emitido no laboratório e nas unidades de colheita. Este contém a seguinte informação: nome do utente, data de colheita, iniciais da unidade de colheita, o número e o tipo de amostra. Para além disso, deve-se verificar se a amostra foi colhida para um recipiente próprio e se tem volume suficiente. Na triagem é também onde se centrifugam as amostras e se separam por áreas para serem colocadas nos respetivos equipamentos.

A.4.1. Pré-tratamento das amostras

Tabela 1 - Pré-tratamento das amostras (1)

Tipo de amostras	Tratamento
Sangue com anticoagulante – citrato de sódio (TP, TTPa, fibrinogénio)	Centrifugação a 2500 rpm durante 10-15 minutos
Sangue sem anticoagulante	Centrifugação a 3000-3500 rpm durante 10-15 minutos, sempre que possível em centrífuga refrigerada
Sangue com anticoagulante – K2EDTA/K3EDTA (hemograma, plaquetas, reticulócitos)	Segue para a respetiva valência, sem tratamento. Exceções: Plasma lipémico (centrifugar o sangue total durante 10 minutos, retirar o plasma e substituir por igual volume de soro fisiológico e homogeneizar bem)
VS, urinas, fezes, exsudados, expetoração e hemoculturas	Segue para a respetiva valência, sem tratamento.

A.4.2. Rejeição de amostras

Para que não haja interferências no resultado, o laboratório definiu uma série de critérios de rejeição de amostras:

- No caso de amostras de **plasma**, rejeita-se quando há evidência de hemólise, existência de microcoágulos, amostra colhida em tubo inapropriado ou volume incorreto no tubo de colheita;
- No caso de **soro**, quando há evidências de hemólise, lipémia ou quantidade insuficiente;
- No caso de amostras de **urina**, com um volume inferior ao necessário para os doseamentos a efetuar ou com evidência de deterioração e/ou contaminação. Urina para urocultura, rejeita-se a amostra quando esta se encontra num frasco não asséptico, em saco de algália, contaminada com fezes ou quando as condições de transporte foram inadequadas.
- Em amostras de **expetoração**, quando está em insuficiente quantidade e excesso de saliva ou quando há evidências de deterioração e/ou contaminação.

As amostras não identificadas ou identificadas de uma forma que suscite dúvidas quanto à identidade do utente e respetivo processo, são igualmente rejeitadas. Ou seja, qualquer amostra não conforme, tendo em conta o tipo de análise a efetuar, é rejeitada.

Após a rejeição de uma amostra, deve-se registar no documento apropriado e informar o utente da necessidade de repetição de colheita e quais as razões. A nova amostra vai manter a mesma identificação e documentação da amostra rejeitada, a menos que seja essa a causa da rejeição.

Quanto aos controlos, calibradores e respetivas alíquotas reconstituídas a partir de substâncias liofilizadas devem conter a data da reconstituição, o número do lote e a rubrica

do técnico que a reconstituiu. Sempre que haja amostras/alíquotas não conformes com os critérios de aceitação devem ser imediatamente eliminadas.

A.5. Conservação das amostras

Preferencialmente, as análises devem ser executadas assim que as amostras chegam ao laboratório para que as condições de preservação não afetem a validade dos resultados. No entanto, e tendo em conta o elevado número de amostras, isto nem sempre acontece. Nestes casos, deve ser efetuado o armazenamento das amostras de acordo com a descrição da técnica aplicável, com exceção de casos mais específicos em que o seguinte pode não ser aplicado.

As análises: hemograma, velocidade de sedimentação (VS), urina tipo II, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) e amostras para microbiologia devem ser processadas no próprio dia de receção.

Para determinados tipos de análises é permitido o armazenamento prévio das amostras nas condições seguintes:

Tabela 2 - Armazenamento prévio das amostras (1)

Amostra	Armazenamento
Soros Urinas 24 horas Sangue total	- Entre 2°C e 8°C: se a análise for efetuada no prazo de 48 horas - Entre -10°C e -20°C: se a análise for efetuada no prazo de 72 a 96 horas
Espermograma	- Até 3 horas: quando colocados na estufa a 37°C
Fezes (exame parasitológico, pesquisa de sangue oculto)	- Entre 2°C e 8°C: se a análise for efetuada no prazo de 48 horas

A.6. Envio a subcontratados

Como existem análises pouco pedidas, ou seja, não satisfazem o número mínimo de pedidos, algumas amostras são enviadas para laboratórios subcontratados, como é o caso das análises: serotonina, calcitonina e catecolaminas, entre outras. Estas devem ser identificadas e enviadas de acordo com as condições descritas nos contratos dos subcontratados. Juntamente com as amostras, é enviada uma lista de trabalho, para que se confira que o que chega ao laboratório subcontratado foi exatamente o mesmo que saiu do laboratório de origem.

A.7. Fluxograma de Trabalho

Após todo o processo da fase pré-analítica, dá-se início à fase analítica, que nos dias de hoje é cada vez mais informatizada e gerida por equipamentos. No entanto, estes equipamentos precisam de manutenção, controlos, calibrações e cuidados que os técnicos de análises clínicas o têm que fazer. Assim, no LFG cada equipamento tem um responsável que no início de cada dia tem de verificar e deixar tudo preparado para o trabalho ao longo do dia. De seguida, apresento o fluxograma de trabalho pelo qual o LFG se rege:

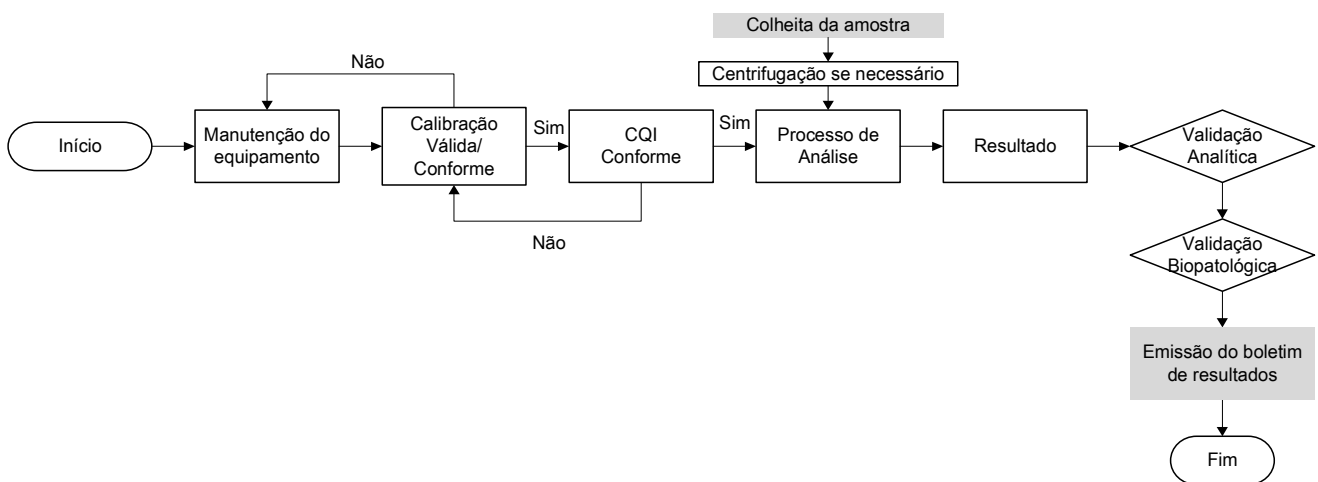


Figura 1 - Fluxograma de trabalho do LFG (1)

B. Bioquímica

Toda a parte laboratorial relativa à área da bioquímica e alguma imunologia serológica é executada no equipamento DxC 700 AU, da Beckman Coulter.

B.1. Equipamento DxC 700 AU



Figura 2 - Equipamento Beckman Coulter – DxC 700 AU – Foto da autora

B.1.1. Métodos de determinação

Este equipamento faz a determinação dos parâmetros através de medição fotométrica, ou seja, os vários componentes químicos da amostra e os reagentes produzem uma reação colorimétrica na cuvete que, através da luz de uma lâmpada halógena, se separa em comprimentos de onda específicos por uma rede de difração. Um fotodetector mede a densidade ótica da mistura de reação em intervalos de 18 segundos durante todo o período de reação. Para amostras com alta concentração, o sistema utiliza água deionizada ou outro diluente para análise de diluição automática. (2)

No LFG, os parâmetros analisados neste equipamento são: albumina, fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), amilase, apoproteína A e B, anti-estreptolisina O (ASO), aspartato aminotransferase (AST), complemento 3 e 4, cálcio, colesterol, creatinaquinase (CK), creatinina no soro e na urina, proteína C reativa (PCR), bilirrubina direta e total, gamaglutamiltransferase (GGT), glucose, lipoproteína de alta densidade (HDL), imunoglobulina A, G e M (Ig A, G e M), fósforo, ferro, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lactato desidrogenase (LDH), lipase, magnésio, fator reumatoide

(FR), proteínas totais, transferrina, triglicéridos (TRG), capacidade de fixação do ferro, ureia, ácido úrico, ionograma (sódio, potássio, cloro), alfa-tripsina, alfa-glicoproteína, proteínas urinárias e microalbuminúria.

B.1.2. Controlo de qualidade Interno (CQI)

Controlos

Para a maior parte dos parâmetros, existem 4 níveis de controlo:

- *Control sérum nível 1;*
- *Control sérum nível 2;*
- *Controllab nível 1;*
- *Controllab nível 2.*

No entanto, existem parâmetros com controlos próprios:

- *Ita* – utilizado para controlar as proteínas específicas (PCR, Ig, ASO, transferrina, complemento 3 e 4, alfa-tripsina, alfa- glicoproteína);
- *Urine chemistry control* – controla a creatinina urinária;
- *Microalbumin control* – controla a microalbuminúria;
- *HDL control nível 1 e 2* – controla o colesterol da fração HDL.

Processamento dos controlos

Os *Control sérum, nível 1 e 2*, são executados no início do trabalho diário, enquanto os *Controllab, nível 1 e 2*, são passados no fim do dia, o que permite ter um controlo com maior abrangência.

B.1.3. Calibração

Num laboratório de análises clínicas, a calibração é um procedimento fundamental na maioria dos equipamentos, de forma a garantir que os dados emitidos por cada um dos instrumentos utilizados refletem, exatamente, os dados de entrada da amostra. Essa calibração é realizada com recurso a materiais baseados em preparações ou em materiais de referência conhecida, permitindo assim fazer a comparação entre as medições do instrumento e esses valores conhecidos. A calibração deve ser feita nas seguintes situações (2):

- Diariamente no caso do ionograma;
- Dia sim, dia não, para a creatinina no soro e urina;
- Quando um lote de reagente é alterado;

- Quando os resultados de CQI ficam fora dos limites especificados (no caso de se verificar que o problema não tem a ver com o controlo, como por exemplo deixar o controlo em cima da bacada);
- Manutenções preventivas ou substituição de peças críticas e o desempenho do controlo de qualidade foi afetado.

B.1.4. Processamento da Amostra

Após a colheita, as amostras são centrifugadas. Quando são colocadas no equipamento, deve-se verificar não só a quantidade de soro para evitar contaminar ou bloquear a sonda de amostra com o meio de separação, como também se não existe fibrina na amostra. Embora o equipamento tenha um mecanismo de deteção de coágulos, é importante verificar a presença dos mesmos. Em particular, no caso de amostras de urina, é importante observar se há matéria suspensa, pois poderá entupir a sonda e causar problemas com os resultados da análise. (2)

B.1.5. Interferências nos resultados

No manuseamento e reposição de reagentes, é de evitar a agitação excessiva, pois pode provocar a ocorrência de bolhas à superfície e originar erros no equipamento. Se houver frascos inclinados, para além de poder danificar a sonda de reagente, pode dar origem a resultados incorretos. Amostras lipémicas, ictéricas e hemolisadas também podem interferir nos resultados. Para ter certeza de que os dados analíticos são precisos, deve-se confirmar (2):

- a) a qualidade da água desionizada;
- b) se todos os testes foram aprovados na calibração;
- c) os dados de controlo de qualidade interno.

C. Hematologia

C.1. Hemograma

O hemograma completo é o teste analítico fundamental para avaliar os três principais componentes celulares do sangue periférico total: glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas. Dentro destes, existem as seguintes determinações:

Tabela 3 – Determinações efetuadas no hemograma completo

Exame		Determinações
Hemograma	Eritrograma	Contagem de eritrócitos (Glóbulos Vermelhos, GV)
		Doseamento de hemoglobina (Hb)
		Hematócrito (Hct)
		Volume Globular Médio (VGM)
		Hemoglobina Globular Média (HGM)
		Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)
		Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW)
		Desvio padrão de RDW
		Percentagem de eritrócitos nucleados
		Número absoluto de eritrócitos nucleados
	Leucograma	Contagem de Leucócitos (Glóbulos Brancos, GB)
		Contagem de Leucócitos não corrigida
		Fórmula Leucocitária: - Neutrófilos (% e Valor Absoluto) - Eosinófilos (% e Valor Absoluto) - Basófilos (% e Valor Absoluto) - Linfócitos (% e Valor Absoluto) - Monócitos (% e Valor Absoluto)
	Plaquetograma	Contagem de Plaquetas (Plq)
		Volume médio das plaquetas (MPV)

Estes ensaios podem ser pedidos em conjunto (hemograma completo), ou separadamente.

Reticulócitos

Há situações onde é solicitada a determinação dos reticulócitos no sangue periférico. Os reticulócitos são eritrócitos anucleados e imaturos que conservam uma pequena rede de organitos basófilos, constituídos por ARN e protoporfirina. A contagem de reticulócitos compreende as seguintes determinações indicadas na tabela seguinte.

Tabela 4 – Determinações para quantificação dos reticulócitos no sangue periférico

Exame	Determinações
Reticulócitos	Contagem de Reticulócitos (% e Valor Absoluto) Fração imatura de reticulócitos (IRF) Volume reticulocitário médio

C.1.1. Equipamento Unicel DXH800

No laboratório LFG, o hemograma é determinado no equipamento Beckman Coulter – Unicel® DxH800.



Figura 3 - Equipamento Beckman Coulter - Unicel DXH 800 – Foto da autora

Métodos de Determinação

Tabela 5- Métodos de determinação com base no manual do DXH 800 (3)

Determinação	Métodos
Glóbulos Vermelhos (GV)	Princípio de Coulter Medido diretamente, multiplicada pelo fator de calibração
Hemoglobina (Hb)	Medição fotométrica
Hematócrito (Hct)	Volume relativo entre os eritrócitos concentrados e o sangue total. Cálculo % [Hct = (VGM × GV) / 10]
Volume Globular Médio (VGM)	O volume médio dos eritrócitos individuais derivado do histograma de GV , multiplicado por um fator de calibração.
Hemoglobina Globular Média (HGM)	O peso de hemoglobina no eritrócito médio. Cálculo [HGM = (Hb/GV) × 10]
Concentração Média de Hemoglobina Globular (CMHG)	O peso médio de hemoglobina numa diluição medida. Cálculo [CMHG = (Hb/Hct) x100]
RDW	A amplitude da distribuição do tamanho da população de eritrócitos derivada do histograma de GV .
Glóbulos Brancos (GB)	Princípio de Coulter Medida diretamente, multiplicada pelo fator de calibração
Fórmula Leucocitária	Tecnologia VCSn
GV nucleados	Tecnologia VCSn
Plaquetas (Plq)	Princípio de Coulter
Volume plaquetar médio (MPV)	O volume médio das plaquetas individuais derivado do histograma de Plq , multiplicado por um fator de calibração.
Estudo Morfológico de Sangue Periférico	Microscopia ótica
Reticulócitos (Ret) %	Tecnologia VCSn Proporção entre o número de reticulócitos e o número total de glóbulos vermelhos.
Reticulócitos – Valor absoluto	Cálculo [(Ret /100) x GV]

Princípio dos métodos

- **Princípio de Coulter**

O método Coulter contabiliza e dimensiona as células com exatidão, através da deteção e da medição das alterações na resistência elétrica quando uma partícula (célula), num líquido condutor (diluyente), passa por uma pequena abertura, funcionando como um isolador. Ou seja, a célula ao passar através da abertura, aumenta momentaneamente a resistência da passagem de corrente entre os elétrodos submersos em cada lado da abertura, o que provoca um impulso elétrico mensurável. Para a contagem, o vácuo utilizado para puxar a suspensão diluída de células através da abertura tem de ter um volume

regulado. O número de impulsos indica o número de partículas e a amplitude de cada impulso elétrico é proporcional ao volume da célula. (3)

- **Medição fotométrica para hemoglobinometria**

O papel do reagente de lise é destruir os eritrócitos e converter uma proporção significativa da hemoglobina num pigmento estável, enquanto deixa os núcleos dos leucócitos intactos. A absorvência do pigmento, medida fotometricamente a 525 nm, é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina da amostra. A exatidão deste método é igual à do método do hemiglobino-cianeto, o método de referência de escolha da hemoglobinometria, recomendado pelo Comité Internacional para a Padronização em Hematologia. (3)

- **Tecnologia VCSn**

O COULTER VCS estabeleceu a tecnologia diferencial utilizando as três medições: volume da célula individual, condutividade de alta frequência e dispersão de luz laser. (3)

- Análise do volume: a análise eletrónica do volume de leucócitos através de corrente de baixa frequência tem sido utilizada desde 1967. Foi avaliada como um possível auxiliar à contagem do diferencial de glóbulos brancos.
- Análise de condutividade: como as paredes celulares funcionam como condutores da corrente de alta frequência, é possível detetar as diferenças nas propriedades isoladoras dos componentes da célula. A corrente caracteriza os elementos nucleares e granulares e a composição química do interior da célula.
- Análise da dispersão da luz: a dispersão da luz é utilizada para a análise de células pois existe uma relação entre o tamanho e refratividade das partículas e o ângulo da luz difundida por um raio de laser.

A combinação da corrente de baixa e alta frequência e da tecnologia de dispersão de luz fornece informações célula a célula, que são traduzidas em gráficos de dados que representam visualmente a população e a densidade diferencial. Assim, diferentes cores indicam diferentes populações (tipos de células) e os tons das cores representam a densidade (concentração): cores escuras para densidade baixa e cores claras para densidade alta. (3)

- **Análise de reticulócitos**

A contagem dos reticulócitos fornece uma forma simples e eficaz de determinar a produção e regeneração de glóbulos vermelhos. O mais comum é utilizar coloração supravital, como novo azul de metileno ou azul cresil brilhante.

Estas colorações precipitam e agregam as substâncias basófilas contidas no reticulócito, resultando num padrão granular que é facilmente visível por microscopia ótica. Como os reticulócitos imaturos são maiores, contêm mais ácido ribonucleico (ARN) e provocam uma maior dispersão da luz, pode-se dizer que o volume da célula e a dispersão da luz aumentam com a sua imaturidade. (3)

C.1.2. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Controlos

Os controlos utilizados são:

- O **Controlo Celular 6C** permite a monitorização do desempenho do sistema para os parâmetros: glóbulos vermelhos, plaquetas, glóbulos brancos e glóbulos vermelhos nucleados.
- O **Controlo Celular Retic-X** monitoriza o desempenho dos reticulócitos.

Processamento dos controlos

São processados 3 níveis de controlo, no mínimo 2 níveis.

- No início e no fim do trabalho diário;
- Após calibração;
- Após manutenções preventivas e corretivas.

O controlo para os reticulócitos apenas é feito quando existe pedidos dos mesmos.

C.1.3. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

Participação em diversos programas de avaliação externa da entidade UK NEQAS e Controllab, nomeadamente:

- Full Blood Count (FBC) – “Contagem de Sangue Total” (UK NEQAS);
- Automated Differential Leucocyte Count (ADLC) – “Contagem Leucocitária Diferencial Automatizada” (UK NEQAS);
- Reticulócitos e contagem automática – Controllab.

C.1.4. Calibração (3)

Para obter o melhor desempenho, deve-se verificar e calibrar todos os parâmetros de contagem do hemograma completo, sendo que os parâmetros “GB diferencial” e “Ret” são calibrados por um representante autorizado da Beckman Coulter.

Relativamente à verificação da calibração, a mesma deve ocorrer:

- conforme exigido pelos procedimentos laboratoriais e regulamentos locais ou nacionais;
- quando os controlos começam a apresentar indícios de tendências incomuns;
- quando os controlos excedem os limites definidos pelo fabricante como aceitáveis;
- se a temperatura média ambiente diferir em mais de 6°C da temperatura de calibração.

O aparelho tem de ser calibrado:

- no momento da instalação;
- após a substituição de qualquer componente que envolva características de diluição ou as medidas primárias (como as aberturas);
- quando recomendado pelo representante da Beckman Coulter;
- se o procedimento de verificação de calibração falhar.

C.1.5. Processamento da Amostra

Para uma correta utilização do equipamento, deve-se homogeneizar, manualmente e com suavidade ou através do agitador automático, as amostras e colocar os tubos nas racks. É importante observar as amostras e verificar se estas apresentam volume suficiente para serem processados em sistema fechado. Caso apresentem um volume que corresponda a uma altura inferior a 1,5mm, devem ser processadas em sistema aberto.

A análise deve ser repetida quando existe uma discrepância de resultados entre os índices eritrocitários, ou entre os resultados obtidos e o histórico ou situação clínica do utente.

C.1.6. Valores de Referência

Os valores de referência, tanto para adultos (sexo feminino e masculino) como para recém-nascidos e crianças, pelos quais o LFG se rege são apresentados nas tabelas seguintes. Importa referir que cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência para garantir uma representação adequada de populações específicas.

Tabela 6 - Valores de referência dos adultos, de acordo com os sexos (4,5)

Parâmetros	Valores de Referência (Sexo Feminino)		Valores de Referência (Sexo Masculino)	
GV ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	3.88 - 4.99		4.32 - 5.66	
Hb (g/dL)	11.8 - 14.8		13.3 - 16.7	
Hct (%)	36 - 44		39 - 50	
VGM (fL)	82 - 98			
HGM (pg)	27.3 - 32.6			
CMHG (g/dL)	31.6 - 34.9			
RDW (%)	9.9 - 15.5			
GB ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	3.9 - 11.1		3.7 - 9.5	
	Valor absoluto ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	%	Valor absoluto ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	%
Neutrófilos	1.7 - 7.5	40 - 80	1.7 - 6.1	40 - 80
Eosinófilos	0.03 - 0.46	1.0 - 6.0	0.03 - 0.46	1.0 - 6.0
Basófilos	0.02 - 0.09	0.0 - 2.0	0.02 - 0.09	0.0 - 2.0
Linfócitos	1.0 - 3.2	20 - 40	1.0 - 3.2	20 - 40
Monócitos	0.2 - 0.6	2.0 - 10.0	0.2 - 0.6	2.0 - 10.0
Ret	50 - 100	0.5 - 2.5	50 - 100	0.5 - 2.5
Plq ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	150 - 400			
MPV (fL)	7.0-10.5			

Tabela 7 – Valores de referência para não adultos (4)

Parâmetros	Recém Nascido	3 dias	1 mês	2 meses	3 - 6 meses	1 ano	2 - 6 anos	6 - 12 anos
GV ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	5.0 - 7.0	4.0 - 6.6	3.0 - 5.4	3.1 - 4.3	4.0 - 5.4	3.9 - 5.1	4.0 - 5.2	4.0 - 5.2
Hb (g/dL)	14 - 22	15 - 21	11.5 - 16.5	9.4 - 13	11.1 - 14.1	11.1 - 14.1	11.1 - 14.1	11.5 - 15.5
Hct (%)	45 - 75	45 - 67	42 - 44	34.3 - 37.3	34.5 - 35.5	33.6 - 34.4	36.7 - 37.3	39.5 - 40.5
VGM (fL)	100 - 120	92 - 118	92 - 116	87 - 103	68 - 84	72 - 84	75 - 87	77 - 95
HGM (pg)	31 - 37	31 - 37	30 - 36	27 - 33	24 - 30	25 - 29	24 - 30	25 - 33
CMHG (g/dL)	30 - 36	29 - 37	29 - 37	28.5 - 35.5	30 - 36	32 - 36	31 - 37	31 - 37
GB ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	10 - 26	7.0 - 23	5.0 - 19	5.0 - 15	6.0 - 18	6.0 - 16	5.0 - 15	5.0 - 13
Ret ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	120 - 400	50 - 350	20 - 60	30 - 50	40 - 100	30 - 100	30 - 100	30 - 100
Plq ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	150 - 450	210 - 500	210 - 500	210 - 650	200 - 550	200 - 550	200 - 450	180 - 400

C.1.7. Interferências nos resultados

Tabela 8 - Interferências nos resultados de hemograma (3)

Parâmetro	Interferentes
GB	Glóbulos vermelhos nucleados; plaquetas gigantes; agregados plaquetários; parasitas da malária; crioglobulinas; micro-linfoblastos; linfócitos muito pequenos; leucócitos fragmentados ou aglutinados; GV resistentes à lise; partículas não lisadas de tamanho >35fl.
GV	Contagem de GB muito elevada; alta concentração de macroplaquetas; auto-aglutinação. Se ocorrer hemólise in vitro, podem ser gerados resultados baixos falsos de GV.
Hb	Lipémia acentuada; Heparina.
VGM	Contagem de GB muito elevada; alta concentração de macroplaquetas; auto-aglutinação.
RDW	Contagem de GB muito elevada; alta concentração de macroplaquetas; auto-aglutinação.
Plq	Plaquetas gigantes; agregados plaquetários; fragmentos de GB; GV muito pequenos; Fragmentos de GV.
GV nucleados	Glóbulos vermelhos resistentes à lise; parasitas da malária; linfócitos muito pequenos ou de várias populações; elevada quantidade de proteínas precipitadas.
Fórmula leucocitária	Granulócitos hipogranulares/agranulares; GV resistentes à lise; linfócitos muito pequenos ou de várias populações; triglicéridos elevados; elevada quantidade de proteínas precipitadas; presença de blastos.
Ret	As inclusões nos eritrócitos corados com novo azul de metileno, se suficientemente numerosas numa amostra; algumas hemoglobinopatias (SS, SC).

C.1.8. Execução de esfregaços sanguíneos para observação ao microscópio

No LFG, apenas se procede à execução de esfregaços de sangue periférico em amostras que evidenciem as seguintes características:

Tabela 9 - Apresentação de evidências para a execução de esfregaços sanguíneos (6)

Parâmetro	Evidência
GB	<4.0 x 10 ⁹ /L ou >30.0 x 10 ⁹ /L
Plq	<100 x 10 ⁹ /L ou >1000 x 10 ⁹ /L
Hb	<7 g/dL ou valor > a 2g/dL em relação ao valor de referência para a idade e sexo
VGM	<75 fl ou >105 fl
CMHG	<30 g/dL
RDW	>22 (sem histórico)

Tabela 9 - Apresentação de evidências para a execução de esfregaços sanguíneos (cont.) (6)

Parâmetro	Evidência
Neutrófilos (Valor absoluto)	<1.0 x 10 ⁹ /L ou >20.0 x 10 ⁹ /L
Linfócitos (Valor absoluto)	>5.0 x 10 ⁹ /L (adultos) e >7.0 x 10 ⁹ /L (crianças <12 anos)
Monócitos (Valor absoluto)	>1.5 x 10 ⁹ /L (adulto) ou >3.0 x 10 ⁹ /L (crianças < 12 anos)
Eosinófilos (Valor absoluto)	>2.0 x 10 ⁹ /L
Basófilos (Valor absoluto)	>0.5 x 10 ⁹ /L
GV nucleados	Presença
Ret (Valor absoluto)	>0.1 x 10 ⁹ /L
Avisos emitidos pelo equipamento ("Flags")	GB imaturos GV fragmentados População dimórfica de GV MPV alterado ou outros erros nas plaquetas Granulócitos imaturos Linfócitos atípicos Presença de Blastos

No caso de os resultados se apresentarem consistentes no contexto dos resultados clínico/laboratoriais atuais e anteriores do utente, não será imperativo fazer o esfregaço de sangue periférico.

Coloração manual dos esfregaços sanguíneos

A coloração dos esfregaços é efetuada com o conjunto de reagentes da Hemacolor e consiste na coloração sucessiva dos mesmos, fixados com Hemacolor I (Metanol), com solução de Hemacolor II (Eosina) e a solução de Hemacolor III (Azul de Metileno).

Técnica de coloração:

1. Mergulhar a lâmina 10 vezes no reagente 1 (Hemacolor I);
2. Escorrer a lâmina em papel absorvente;
3. Mergulhar a lâmina 10 vezes no reagente 2 (Hemacolor II);
4. Escorrer a lâmina em papel absorvente;
5. Mergulhar a lâmina no reagente 3 (Hemacolor III) durante aproximadamente 1 minuto;
6. Passar a lâmina por água corrente para remover o excesso de corante;
7. Deixar secar, na vertical, ao ar.

C.2. Velocidade de Sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação dos eritrócitos é uma reação inespecífica que mede a presença e gravidade do processo patológico. A sua utilidade está na avaliação de pacientes com sintomas inexplicáveis quando há suspeita de inflamação e de doença infecciosa, ou quando um diagnóstico específico não está disponível de forma eficaz através de outros testes. (7)

No processo de sedimentação podem ser distinguidas três fases (7):

- 1 - Fase da agregação, na qual os eritrócitos formam rouleaux;
- 2 - Fase de sedimentação rápida, onde ocorre agregação e sedimentação dos eritrócitos a uma velocidade maior e constante;
- 3 - Fase de concentração, na qual ocorre o retardamento da sedimentação dos glóbulos vermelhos no fundo do tubo.

C.2.1. Equipamento Ves matic 30

No laboratório LFG, a determinação da VS é feita no equipamento Ves matic 30.



Figura 4 - Equipamento Ves matic 30 – Foto da autora

Trata-se de um equipamento de bancada, programado para analisar a VS de até um máximo de 30 amostras de sangue, simultaneamente, contidas em tubos específicos.

C.2.2. Método de Determinação

Este procedimento é realizado de forma totalmente automatizada (agitação e leitura) e os resultados podem ser comparados com os obtidos pelo método de Westergren, no qual o resultado demora cerca de 1 ou 2 horas.

O Ves matic 30 utiliza a técnica de Westergren modificada, pois determina a VS em 26 ou 45 minutos. Com os ciclos rápidos, o tempo reduz-se a 11 ou 15 minutos. Os sensores optoeletrónicos leem automaticamente o nível de hemossedimentação (resultados expressos em milímetro por hora), sendo os dados impressos ou exibidos no monitor. (8)

No caso de ocorrer algum problema no equipamento, a determinação da VS deve ser feita manualmente através da técnica de Westergren que se processa da seguinte forma sequencial:

- 1 - Após a colheita, o sangue deve ser distribuído para tubo adequado e homogeneizada a amostra;
- 2 - Colocação do tubo no suporte que permite manter a pipeta de Westergren na posição vertical;
- 3 - Perfuração, com a pipeta, tendo o cuidado de verificar que a mesma alcança o fundo do tubo;
- 4 - Puxar o êmbolo, de plástico, da pipeta Westergren, verificando se o sangue foi aspirado até atingir a marcação (zero).

A leitura é feita após uma hora, registando a distância em mm, desde o nível de marcação zero até à camada de glóbulos vermelhos sedimentados através da escala descendente da pipeta.

C.2.3. Controlo de qualidade interno (CQI)

Controlos

Existem dois níveis de controlos: o normal e o patológico.

Estes controlos são compostos estáveis, diluídos e manuseados como qualquer outra amostra, compostos por eritrócitos humanos estabilizados e suspensos num tampão que não reage com bactérias nem fungos, oferecendo a possibilidade de determinar a exatidão e precisão dos resultados. (8)

Processamento dos controlos

São processados os 2 níveis de controlo, no início do trabalho diário, ou seja, todas as manhãs, antes de serem inseridas as amostras no equipamento, passam-se ambos os controlos e verificam-se os respetivos resultados.

C.2.4. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

Para a velocidade de sedimentação, a avaliação externa da qualidade provém da entidade INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, para onde são enviados os valores das AEQ's que são posteriormente avaliados.

C.2.5. Processamento da Amostra

Logo após a colheita num tubo específico com citrato de sódio, a amostra deve ser homogeneizada de modo que todo o anticoagulante se misture.

Ao serem inseridas no equipamento, deve-se verificar se existe uma correta quantidade de amostra pois, caso seja insuficiente, o equipamento imprime uma mensagem de erro, o mesmo ocorrendo quando o tubo contém excesso de amostra. Em ambos os casos, o mais correto é repetir a colheita de sangue para que haja uma correta proporção entre a amostra e o anticoagulante. (7)

Devem repetir-se as amostras que se apresentem com resultados incongruentes com os restantes resultados em relação a testes de vindas anteriores ou à situação clínica do utente. Para além disso, a repetição deve ser feita sempre que o técnico responsável considerar adequado repetir o teste com o intuito de garantir a qualidade do resultado.

C.2.6. Valores de Referência

De acordo com o manual do equipamento (8), os valores de referência encontram-se entre:

- Homens: 1-10 mm/h
- Mulheres: 1-15 mm/h

C.2.7. Interferências nos resultados

Uma agitação incorreta provocará o aparecimento de coágulos que irão afetar os resultados, assim como, a formação de bolhas pode interferir na leitura do resultado. A sedimentação é um processo que pode sofrer interferência pelas variações de temperatura e pela presença de vibrações. Por outro lado, o processo de formação de rouleaux de eritrócitos

depende da concentração de proteínas de fase aguda (por exemplo, fibrinogénio) e, em menor grau, as globulinas. Para além disto, a VS é afetada pelo nível de hemoglobina, hematócrito, pelas variações no número, no tamanho e na forma dos eritrócitos. (7)

C.2.8. Interpretação dos resultados

Os valores elevados de VS podem ser encontrados em casos de tuberculose, mielomas múltiplos, leucemia, linfomas, cancro da mama e de pulmão, lúpus eritematoso sistémico (LES) e insuficiência respiratória. Também se encontram valores muito elevados na presença de diversos tipos de infeções e especialmente em casos de metástases hepáticas e em transtornos inflamatórios graves e crónicos. Em geral, a VS está aumentada em infeções gerais agudas e em condições inflamatórias agudas localizadas. Este parâmetro fornece ainda informações úteis quando usado como critério diagnóstico para arterite temporal, polimialgia reumática, monitorização da atividade de arterite de células gigantes e artropatias inflamatórias, bem como acompanhamento da evolução de pacientes com artrite reumatóide e certas doenças malignas, incluindo a doença de Hodgkin. (7,9)

C.3. Hemoglobina Glicada (HbA1c)

A medição da HbA1c é especialmente útil no paciente diabético. Enquanto os níveis de glicose no sangue flutuam amplamente, a formação de HbA1c ocorre lenta e continuamente, refletindo a glicemia média nas últimas 8 a 12 semanas. Assim, esta medição permite um controlo glicémico nos cuidados e tratamentos prestados aos doentes com Diabetes Mellitus. A determinação da HbA1c deve ser realizada, pelo menos, semestralmente em todas as pessoas com diabetes. Pode ser realizada, com maior frequência, com intervalo mínimo de 3 meses, em indivíduos com diabetes cujo tratamento mudou recentemente ou que não alcançaram os objetivos terapêuticos preconizados. (10)

C.3.1. Equipamento ADAMS A1c HA-8180T

O equipamento utilizado para efetuar a medição da HbA1c no LFG é o ADAMS A1c HA-8180T.



Figura 5 - Equipamento ADAMS A1c HA-8180T- Foto da autora

C.3.2. Métodos de determinação

Este equipamento utiliza o método HPLC (método de referência), o que fornece resultados precisos, incluindo cromatograma detalhado. Apresenta uma vantagem nos testes de beta talassémia pois, para além da medição de HbA1c, permite também detetar HbA2, Hb F, Hb S e Hb C, Hb E e Hb D. Outra vantagem é a rapidez de execução da análise, uma vez que emite o relatório em menos de 4 minutos. (11)

C.3.3. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Controlos

São utilizados os seguintes tipos de controlo neste equipamento:

- Controlo liofilizado HbA1c: nível normal e patológico;
- Controlo liofilizado Hb F e A2: nível normal e patológico.

Processamento de controlos

Todas as manhãs, antes de serem introduzidas as amostras, os 2 controlos são passados nos 4 níveis e verificados de acordo com os intervalos dados pelo fornecedor.

C.3.4. Processamento da amostra

Após a colheita num tubo contendo anticoagulante e correta homogeneização, não há necessidade de tratamento adicional.

As amostras são inseridas no equipamento que, através da função automática de agitação da amostra antes da medição, evita a flutuação nos resultados da medição causada pela sedimentação das células sanguíneas.

C.3.5. Valores de referência

Os valores normais da HbA1c variam entre 4.5% e 5.7%. (entre 33 mmol/mol e 42 mmol/mol de hemoglobina) (12)

C.3.6. Interferência nos resultados

Na figura 6, estão representados exemplos de fatores que interferem nos resultados obtidos de HbA1c.

<p>1. Eritropoiese HbA1c aumentada: deficiência de ferro ou de vitamina B12, diminuição da eritropoiese. HbA1c diminuída: administração de eritropoietina, ferro ou vitamina B12, reticulocitose, doença hepática crónica.</p>
<p>2. Alteração da Hemoglobina Alterações genéticas ou químicas na hemoglobina: hemoglobinopatias, HbF, metahemoglobina, podem aumentar ou diminuir a HbA1c.</p>
<p>3. Glicação HbA1c aumentada: alcoolismo, insuficiência renal crónica, diminuição do pH intraeritrocitário. HbA1c diminuída: aspirina, vitamina C e E, algumas hemoglobinopatias, aumento do pH intraeritrocitário. HbA1c variável: determinantes genéticas.</p>
<p>4. Destruição dos eritrocitos HbA1c aumentada: aumento do tempo de vida dos eritrocitos: esplenectomia. HbA1c diminuída: diminuição do tempo de vida dos eritrocitos: hemoglobinopatias, esplenomegalia, artrite reumatoide, fármacos tais como, antirretrovirais, ribavirina e dapsona.</p>
<p>5. Doseamento HbA1c aumentada: hiperbilirrubinemia, hemoglobina carbamilada, alcoolismo, doses elevadas de aspirina, consumo crónico de opiácios. HbA1c diminuída: hipertrigliceridemia. HbA1c variável: hemoglobinopatias.</p>

Figura 6 - Exemplos de fatores que influenciam a determinação da HbA1c (10)

C.3.7. Interpretação dos resultados

Segundo a Direção Geral de Saúde (10), valores de HbA1c iguais ou superiores a 6,5% (≥ 48 mmol/mol de hemoglobina) correspondem a um dos critérios para diagnóstico de Diabetes Mellitus.

C.4. Fatores de Coagulação

C.4.1. Equipamento Stago Compact Max

No laboratório, as análises relativas à coagulação são realizadas no equipamento Stago Compact Max.



Figura 7 - Equipamento STA Compact Max – Foto da autora

Este equipamento é um dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que permite controlar patologias ligadas à hemostasia. É utilizado para 3 medições distintas: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogénio.

C.4.2. Método de Determinação

Estas técnicas baseiam-se no princípio de medição por cronometria, que consiste em medir variações da amplitude de oscilação da esfera (depende da viscosidade do meio) na cuvete graças a sensores eletromagnéticos. A intensidade do campo magnético de monitorização varia consoante o tipo de análise e o tipo de coágulo esperado. O sistema de deteção da variação da amplitude do movimento da esfera é constituído por duas bobinas de medição: a emissora, que emite um campo eletromagnético e a recetora. Essas variações do campo magnético, através de um algoritmo de cálculo, deduzem a amplitude de oscilação e assim é possível determinar com precisão os tempos de coagulação. (13)

C.4.3. Tempo de Protrombina (TP)

A determinação do tempo de protrombina é indicada para monitorizar a terapia com anticoagulante oral de antagonistas da vitamina K utilizando a Relação Internacional Normalizada (INR). Para além disso, avalia a função hepática e a atividade dos fatores

envolvidos na via extrínseca (fatores V, VII, X, II, I) e na via comum, isto é, na formação de fibrina. (9,13)

O princípio do TP consiste em comparar, em presença de tromboplastina cálcica, o tempo de coagulação do plasma a estudar com a de um controlo normal utilizado como referência. (13,14)

Cálculo de resultados e intervalo de referência

O valor do INR é calculado pelo equipamento através da fórmula $INR = (TP \text{ do doente} / TP \text{ normal})^{ISI}$, em que o valor do ISI (índice de sensibilidade internacional), peculiar ao lote de reagente, é introduzido no equipamento através da leitura do código de barras presente na caixa do reagente. O INR é utilizado para corrigir as variações devidas às diferentes tromboplastinas utilizadas pelos laboratórios de análises clínicas. (13)

De acordo com a informação do fornecedor do reagente, o TP médio definido é $13,5 \pm 1,8$ segundos. (14)

Interpretação clínica laboratorial

As causas mais comuns de TP prolongado são as seguintes: deficiência dos fatores de coagulação que o teste avalia, terapêutica com anticoagulantes orais (antagonistas da vitamina K), insuficiência hepática (cirrose, hepatite), dieta inadequada de vitamina K, coagulação intravascular disseminada (CID). A presença de inibidores da trombina e do fator Xa na amostra, podem provocar um prolongamento do TP. (9)

Interferências

Existem algumas interferências que podem afetar o resultado do TP, como é o caso de alguns fármacos de administração comum ou alimentos que apresentam vitamina K. Microcoágulos originam uma redução importante dos tempos medidos enquanto uma coagulação mais extensa prolonga estes mesmos tempos (consumo dos fatores e fibrinogénio). (14)

C.4.4. Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)

A determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada tem como objetivo avaliar a via intrínseca e a via comum da coagulação através da presença de cefalina (substituto plaquetário) e de caulino (ativação standardizada do fator XII). (15)

Assim, permite estudar globalmente a atividade dos fatores de coagulação XII, XI, IX, VIII, X, V, II e I. Esta determinação também é útil na monitorização da terapia de heparina com heparina não fracionada (HNF). (9)

Intervalos de referência

Os valores de referência situam-se entre 27.2 e 32 segundos. (15)

Interpretação clínica laboratorial

Observa-se um prolongamento do TTPa nos casos seguintes: defeito nos fatores que o teste estuda, presença de inibidores específicos dos fatores de coagulação (anticoagulante lúpico ou terapêutica anticoagulante como heparina ou varfarina). Para além disso, uma venipunção traumática também prolonga o valor. Contrariamente, verifica-se uma diminuição do TTPa quando há um excesso de trombina, levando a um maior risco de trombose venosa. (9)

Interferências

Existem algumas interferências nomeadamente o hematócrito muito aumentado (por ex: policitemia) ou reduzido (por ex: anemias) que altera a concentração de citrato ou contaminação da amostra com EDTA. Amostras lipémicas, ictericas ou com coágulos também podem provocar interferências. Para além disso, os resultados do TTPa podem ser alterados por diversos fármacos de administração comum. Devem efetuar-se análises sucessivas a fim de determinar a causa dos resultados anormais não esperados. Em casos de TTPa prolongado, faz-se uma mistura 50:50 do plasma do paciente com um plasma normal para distinguir uma deficiência de fatores ou a presença de inibidor. A correção indica a deficiência de fator(es) e a falta de correção sugere a presença de inibidor. (9)

C.4.5. Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma glicoproteína, cuja concentração plasmática, em relação aos outros fatores de coagulação, é elevada. É sintetizado a nível hepático e é transformado em fibrina pela trombina. Esta técnica baseia-se na presença de um excesso de trombina, o tempo de coagulação de um plasma, diluído em proporções adequadas, depende diretamente do nível de fibrinogénio plasmático (método de Clauss). (12)

Intervalos de referência

O intervalo de referência para o fibrinogénio é entre 200 e 400 mg/dL. (16)

Interpretação clínica laboratorial

Observa-se um aumento dos níveis de fibrinogénio nos casos de diabetes, de síndrome inflamatório, de obesidade (16), durante reações de fase aguda e durante a gravidez, por exemplo. De salientar que uma elevação do fibrinogénio está associada a um aumento de risco de enfarte de miocárdio. Por outro lado, há uma diminuição dos níveis de fibrinogénio na doença hepática, uma vez que conseqüentemente existe uma diminuição da síntese. (12)

Interferências

Quando o ensaio do fibrinogénio se destina a ser realizado em amostras colhidas de doentes a receber terapêutica trombolítica e sem a adição de uma mistura de anticoagulante contendo um inibidor de plasmina no tubo de colheita, os resultados do fibrinogénio podem ser subestimados. (16)

C.4.6. Controlo interno da qualidade (CQI)

Controlos

Para verificar a exatidão e a reprodutibilidade dos resultados, utiliza-se o controlo STA– ROUTINE QC, com 2 níveis de controlo: o normal e o patológico.

Processamento dos controlos

São processados os 2 níveis de controlo, no início do trabalho diário. Ou seja, todas as manhãs, antes de serem inseridas as amostras no equipamento, ambos os controlos são passados e verifica-se os respetivos resultados.

C.4.7. Processamento da amostra

Após a colheita de plasma de citrato trissódico (1:9), a amostra deve ser centrifugada e manuseada com precaução para preservar a atividade dos diversos fatores de coagulação. Assim, um dos cuidados com este tipo de análises é verificar a qualidade da centrifugação, assim como da temperatura de conservação da amostra. Para além disso, deve ser sempre verificado se existe plasma em quantidade suficiente, a ausência de espuma, coágulo ou microcoágulo que possa perturbar os resultados. (13)

Deve-se repetir as amostras que se apresentem com resultados incongruentes em relação a testes de vindas anteriores ou à situação clínica do utente. Para além disso, repete-se sempre que o técnico responsável considerar adequado a repetição do teste com o intuito de garantir a qualidade do resultado.

C.5. Grupos Sanguíneos e Coombs

C.5.1. Equipamento WaDiana Compact

Relativamente às análises referentes aos grupos sanguíneos, coombs direto e indireto estas são executadas no equipamento WaDiana Compact.



Figura 8 - Equipamento WaDiana Compact – Foto da autora

C.5.2. Grupos Sanguíneos

Os eritrócitos reagentes Serigrup Diana A1/B em conjunto com o cartão DG Gel ABO/Rh destinam-se à determinação do grupo ABO reverso e Rh (D) em técnica de gel. O sistema ABO é definido pela presença ou ausência dos antígenos A e/ou B nos eritrócitos e pela correspondente presença ou ausência de anticorpos no soro.

Métodos de determinação

A determinação do grupo ABO reverso baseia-se na presença ou ausência de isoaglutininas anti-A e/ou anti-B no soro do paciente, utilizando eritrócitos de um grupo sanguíneo conhecido: A1, A2, B e O. As isoaglutininas anti-A e anti-B são anticorpos naturais produzidos por pessoas com falta de antígenos A e B. As isoaglutininas anti-A e anti-B presentes no soro humano ligam-se aos eritrócitos que possuem os antígenos correspondentes, resultando na aglutinação direta. (17)

O princípio deste método baseia-se na técnica em gel descrita por Lapiere para a deteção das reações de aglutinação de eritrócitos. Os cartões DG Gel são compostos por oito microtubos. O microtubo do cartão é pré-enchido com solução gel tamponada composta por anticorpos monoclonais específicos (anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D e anti CDE). A aglutinação ocorre quando os antígenos eritrocitários reagem com os anticorpos correspondentes, presentes na solução de gel ou na amostra de soro ou plasma. A coluna funciona como um filtro que retém os eritrócitos aglutinados à medida que a atravessam durante a centrifugação do cartão. Esta coluna separa os eritrócitos aglutinados dos não aglutinados com base no tamanho. Os eritrócitos aglutinados são capturados no topo ou ao longo da coluna, ao contrário dos eritrócitos não aglutinados que se concentram no fundo da coluna, formando um sedimento celular. (18)

Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Controlos

O controlo utilizado é o Extended IV Control, que apresenta 4 níveis:

- QCX1- Grupo A₂B Positivo;
- QCX2- Grupo A Positivo;
- QCX3- Grupo B Positivo;
- QCX4- Grupo O Negativo.

Processamento dos controlos

Sempre que são feitas amostras, passa-se 1 nível de controlo.

Quando à mudança de lote são processados os 4 controlos.

Apresentação de resultados

Tabela 10 - Apresentação dos resultados dos grupos sanguíneos (18)

Grupo ABO	Rh
O	D Positivo
A	D negativo
B	
AB	

Interferências nos resultados

De seguida, serão mencionadas algumas das possíveis interferências (18):

- Amostras grosseiramente hemolisadas, turvas ou com coágulos podem produzir resultados falsos positivos ou falsos negativos;
- A expressão de antígenos pode ser enfraquecida nos eritrócitos de pessoas com leucemia ou outras doenças malignas;
- Podem ser observadas discrepâncias entre os grupos direto e inverso em doentes com níveis baixos ou inexistentes de isoaglutininas: recém-nascidos de 4-6 meses, idosos, pacientes com imunodeficiências ou anticorpos extremamente diluídos devido a procedimentos de transfusão de plasma;
- Presença de rouleaux provocada por um excesso de proteínas no soro, presença de proteínas anormais e fármacos podem causar falsas reações positivas.

C.5.3. Coombs - Anti-globulina Direta e Indireta (19)

O objetivo do teste Coombs:

- **Direto** – Detetar eritrócitos sensibilizados *in vivo* por imunoglobulinas e/ou frações complementares. Um teste negativo não significa a ausência de doença hemolítica do recém-nascido, especialmente em casos em que há incompatibilidade ABO;
- **Indireto** - Detetar anticorpos de eritrócitos presentes no soro ou plasma do doente por sensibilização *in vitro* dos eritrócitos. Numa deteção positiva, o autocontrolo indicará se o resultado positivo foi provocado pela presença de um autoanticorpo, de um aloanticorpo ou de ambos. Este teste também pode ser utilizado como uma titulação de anticorpos contra antígenos de eritrócitos. Neste caso, a amostra de soro ou plasma deve ser diluída no tampão adequado.

Métodos de determinação

O princípio deste teste é baseado na técnica de gel descrita por Lapierre, para deteção de aglutinação de eritrócitos. O microtubo do card foi pré-enchido com uma solução de gel tamponada composta por uma mistura de antiglobulina humana (anti-IgG) com anticorpos monoclonais anti-C3d. A aglutinação ocorre quando os eritrócitos sensibilizados *in vivo* ou *in vitro* por anticorpos IgG reagem com anticorpos antiglobulina humana presente na solução gel. A coluna de gel funciona como filtro que retém os eritrócitos aglutinados à medida estes a atravessam durante a centrifugação do card. A separação dos eritrócitos aglutinados dos eritrócitos não aglutinados é realizada com base no tamanho: os aglutinados são capturados no topo ou ao longo da coluna, enquanto os não aglutinados concentram-se no fundo da coluna, formando um sedimento celular.

Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Inclui-se os controlos positivos e negativos nos testes em cada dia de utilização.

Apresentação dos resultados

O resultado é:

- **Positivo** - quando é visível aglutinação e/ou hemólise dos eritrócitos no microtubo, o que indica a presença de anticorpos IgG na amostra de soro ou plasma ou revestidos nos eritrócitos;
- **Negativo** - quando não é visível qualquer aglutinação ou hemólise dos eritrócitos no microtubo.

Devem ser repetidas as amostras com resultados discordantes entre a prova direta e reversa ou em casos em que os resultados sejam discordantes com histórico do doente.

Interferências nos resultados

Algumas das possíveis interferências são:

- Amostras grosseiramente hemolisadas, turvas ou com coágulos pois podem produzir resultados falsos positivos ou negativos;
- A atividade dos anticorpos pois podem diminuir nas pessoas de idade, crianças ou pessoas com doença;
- A presença de rouleaux, provocada por um excesso de proteínas no soro, assim como a presença de proteínas anormais e fármacos podem causar falsas reações positivas.

D. Imunologia

D.1. Autoimunidade

As doenças autoimunes são caracterizadas por padrões de autoanticorpos encontrados nos soros dos pacientes. Uma das tecnologias simples de diagnóstico para estas doenças são os imunoensaios em linha (LIA) que são compostos por antigénios em linhas, específicos da doença, sobre uma membrana de nitrocelulose. Os autoanticorpos ligados tornam-se visíveis através de anticorpos secundários conjugados com HRP (peroxidase de rábano) e um substrato específico para LIA. Os resultados são facilmente detetados por comparação com a linha cut-off que simplifica a determinação de amostras positivas: acima da intensidade da cor da banda de cut-off a amostra é positiva e abaixo negativa. Existe também relação entre o grau de intensidade e a positividade da amostra. Assim, este ensaio permite a deteção muito precoce da presença de autoanticorpos. (20)

De seguida serão referidos os imunoensaios mais solicitados, relativamente à pesquisa de autoanticorpos que se inserem nos ramos da Reumatologia e da Gastroenterologia.

D.1.1. Reumatologia

O imunoensaio com maior abrangência é o ANA-LIA XL que é composto por 18 antigénios: dsDNA, nucleossoma, histona, SmD1, PCNA, P0, SS-A/Ro 60, SS-A/Ro 52, SS-B/La, CENP-B, Scl70, U1-snRNP, AMA M2, Jo-1, PMScI100, Mi-2, Ku 70/80 e DFS70 (marcador de exclusão para doenças reumáticas sistémicas). Este imunoensaio permite a determinação qualitativa de anticorpos IgG antinucleares para melhorar a precisão no diagnóstico de doenças reumáticas: LES, Síndrome de Sjögren, Síndrome CREST, Esclerodermia, Doença Mista do Tecido Conjuntivo (MCTD), em que há uma característica sobreposta de pelo menos duas doenças do tecido conjuntivo, Colangite Biliar Primária (PBC), Esclerose sistémica (Ssc) e Miosite. (21)

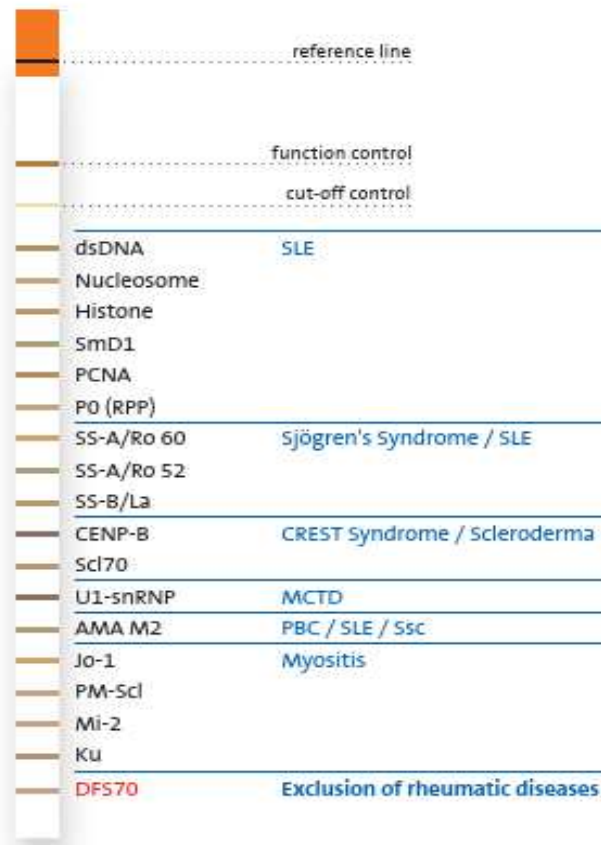


Figura 9 - Imunoensaio ANA-LIA-XL com representação dos antígenos e respetivas doenças associadas (21)

D.1.2. Gastroenterologia

Existem várias doenças autoimunes gastrointestinais que podem ser diagnosticadas através da identificação da presença de autoanticorpos que têm como alvo os próprios tecidos do corpo, levando à inflamação e sintomas diversos que afetam gravemente a qualidade de vida do paciente e, potencialmente, tornando-se fatal se não for diagnosticado. O imunoensaio Gastro-LIA é utilizado para a deteção de autoanticorpos IgA e IgG deste tipo de doenças. Apresenta cinco antígenos diferentes: d-Gliadina, transglutaminase tecidual (tTg), ASCA, PCA e fator intrínseco para identificar autoanticorpos em pacientes que sofrem de doenças autoimunes gastrointestinais, como a doença celíaca, doença de Crohn e anemia perniciosa. (22)

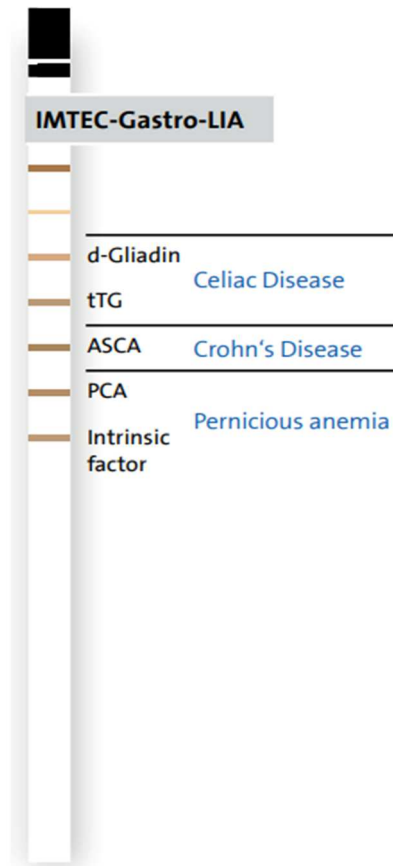


Figura 10 - Imunoensaio Gastro-LIA com representação dos antígenos e respetivas doenças associadas (22)

D.2. Autoimunidade por Imunofluorescência Indireta (IFI)

Um outro diagnóstico e estudo das doenças autoimunes é feito através de técnicas laboratoriais avançadas para deteção de anticorpos antinucleares (ANA) como é o caso da técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Esta técnica utiliza como substrato a combinação de células HEp-2 (Human Epithelial type 2) e secções congeladas de fígado de primata. Este dispositivo de teste foi concebido para a determinação *in vitro* qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos humanos em amostras de doentes para apoiar o diagnóstico de várias doenças autoimunes, como LES, MCTD, artrite reumatóide, esclerose sistémica progressiva, Síndrome de Sjögren, entre outras. (23)

Os campos de teste são incubados com a amostra diluída do doente. Se a reação for positiva, os anticorpos específicos ligam-se aos antígenos. Num segundo passo, os anticorpos ligados são corados com anticorpos anti-humanos marcados com fluoresceína e visualizados utilizando um microscópio de fluorescência. As células apresentam uma fluorescência distinta que é caracterizada por determinados padrões que estão associados a diferentes doenças autoimunes. No caso de amostras negativas, não existe fluorescência

específica. Se o teste de imunofluorescência for positivo, é possível realizar vários ensaios mono específicos subsequentes (ex: ensaios enzimáticos) para determinar para que antigénios específicos os anticorpos são direcionados. (23)

D.3. Imunoensaios

D.3.1. Equipamento Architect i2000SR

O equipamento utilizado no LFG para determinação quantitativa e qualitativa de antigénios e anticorpos relativos a determinadas patologias é o Architect i2000SR.



Figura 11 - Equipamento Architect i2000 SR – Foto da autora

Métodos de Determinação

De acordo com as informações do fornecedor para os parâmetros analisados, este equipamento utiliza a tecnologia CMIA (imunoensaio quimioluminescente de micropartículas), no qual a amostra e as micropartículas paramagnéticas são combinadas. Após uma primeira lavagem o conjugado é adicionado para criar uma mistura de reação e com outro ciclo de lavagem, a solução pré-ativadora (contém peróxido de hidrogénio) e a solução ativadora (contém hidróxido de sódio) são adicionadas. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLU). Existe uma relação direta entre a quantidade de antigénio e anticorpos na amostra e as RLU detetadas pelo sistema ótico do equipamento.

Parâmetros analisados

Indicam-se seguidamente alguns dos parâmetros analisados pelo equipamento.

➤ *Marcadores Tumorais*

Tabela 11 - Marcadores tumorais pesquisados no equipamento Architect i2000SR

Nome	CA 15-3 (24)	CA 125 II (25)
<i>Finalidade de uso</i>	Determinação quantitativa do antígeno definido pelo anticorpo DF3 em soro e plasma humanos. Utilizado para monitorização de doentes com cancro da mama nos estádios II e III.	Determinação quantitativa do antígeno definido pelo anticorpo OC125 em soro e plasma humanos. Utilizado como meio auxiliar na monitorização da evolução da doença e respetiva terapêutica de doentes com cancro invasivo do epitélio do ovário.
<i>Constituição dos reagentes</i>	<u>Revestimento das micropartículas:</u> anticorpo 115D8 <u>Conjugado:</u> anticorpos DF3 marcado com acridina	<u>Revestimento das micropartículas:</u> anticorpos OC125 <u>Conjugado:</u> anticorpos M11 marcado com acridina
<i>Diluição</i>	Amostras com um valor superior a 800 U/ml são diluídas com o protocolo de diluição automática ou manual (1:5).	Amostras com um valor superior a 1000 U/ml são diluídas com o protocolo de diluição automática ou manual (1:10).
<i>Resultados</i>	O cálculo é feito através do método de regressão logística de 4 parâmetros para gerar uma curva de calibração. Em mulheres saudáveis, o valor é inferior a 31,3 U/ml. Em doentes já diagnosticados, um aumento e diminuição dos valores de ensaio estão correlacionados com a progressão e a regressão da doença, respetivamente.	O cálculo é feito através do método de regressão logística de 4 parâmetros para gerar uma curva de calibração. Em mulheres saudáveis, o valor é inferior ou igual a 35,0 U/ml. Valores sistematicamente elevados podem estar associados com doença maligna e resposta inadequada ao tratamento, enquanto que valores reduzidos podem indicar uma resposta favorável ao tratamento.

➤ *Serologia Hepatite A*

Nome: HAVAc-IgM e IgG (26,27)

Finalidade de uso: Deteção qualitativa de anticorpos IgM e IgG contra o vírus da hepatite A (HAV) em soro e plasma humanos. Este teste é utilizado como meio auxiliar no diagnóstico de infeção viral pelo vírus da hepatite A. Os anticorpos IgM normalmente atingem o pico no primeiro mês da doença e pode persistir até 6 meses. A presença de anticorpos IgG, associado a IgM não reativo, indica infeção passada pelo vírus da hepatite A ou vacinação contra o HAV.

Constituição dos reagentes:*Tabela 12 - Constituição dos reagentes para deteção de anticorpos IgM e IgG do HAV*

	IgM (26)	IgG (27)
<u>Revestimento das micropartículas</u>	Vírus da hepatite A	
<u>Conjugado</u>	Anticorpos anti-IgM humana marcado com acridina	Anticorpos anti-IgG humana marcado com acridina

Diluição: Para estes ensaios, não podem ser analisadas amostras diluídas.

Resultados: a presença ou ausência de anticorpos IgM e IgG na amostra é determinada comparando o valor de quimioluminescência na reação com o valor do cut-off determinado a partir de uma curva de calibração ativa. Se o valor for superior ou igual ao valor de cut-off, a amostra é considerada reativa.

Para **anticorpos IgM (26)**:

- Um valor de amostra $\geq 1,20$ é considerado reativo;
- As amostras com um valor entre 0,80 e 1,20 são consideradas em zona cinzenta;
- Amostra com valor $< 0,80$ é considerada não reativa.

Recomenda-se que os doentes que apresentem resultados reativos na zona cinzenta sejam cuidadosamente monitorizados com intervalos de aproximadamente uma semana. Esta monitorização servirá para distinguir níveis crescentes associados à infeção aguda, de níveis decrescentes ou estáveis de anticorpos IgM anti-HAV, frequentemente associados à recuperação.

Para **anticorpos IgG (27)**:

- Valores iguais ou superiores a 1,00, são consideradas reativas para anticorpos IgG anti-HAV;
- Amostras com valores inferiores a 1,00, são consideradas como não reativas.

➤ *Serologia Hepatite B*

Nome: HBsAg Qualitative II (28)

Finalidade de uso: Deteção qualitativa do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em soro e plasma humanos, incluindo em amostras colhidas após a morte. Este antígeno é responsável pela ligação do vírus às células hepáticas e é a estrutura alvo dos anticorpos neutralizadores. Para além disso, é o primeiro marcador serológico (1 a 10 semanas após a exposição e 2 a 8 semanas antes do aparecimento dos primeiros sintomas), persiste durante a fase aguda e desaparece mais tarde durante o período de convalescença.

Este teste é utilizado como meio auxiliar no diagnóstico de infeção pelo HBV, como teste de rastreio para evitar a transmissão de HBV a recetores de sangue, componentes de sangue, células, tecidos e órgãos.

Constituição dos reagentes:

Revestimento das micropartículas: anticorpo anti-HBs

Conjugado: anticorpos anti-HBs marcado com acridina

Diluição: Para este ensaio, não podem ser analisadas amostras diluídas.

Resultados: a presença ou ausência de antígeno na amostra é determinada comparando o valor de quimioluminescência na reação com o valor do cut-off determinado a partir de uma curva de calibração ativa.

- Valores $\geq 1,00$, a amostra é reativa pelo que há a necessidade de repetir o teste em duplicado: se ambos forem não reativos, então a amostra é considerada não reativa; se um ou ambos os resultados forem reativos, a amostra é considerada repetidamente reativa e tem que ser confirmada através de um ensaio de neutralização.
- Amostras com valores $< 1,00$, são consideradas como não reativas pelo que não é necessário repetir o teste.

Para além da deteção do antígeno de superfície da hepatite B, através deste mesmo equipamento, é possível a deteção:

- **Quantitativa de anticorpos contra o antígeno de superfície (anti-HBs)** - utilizado para monitorizar o sucesso da vacinação contra a hepatite B, assim como, monitorizar a convalescença e a recuperação de indivíduos infetados. A presença deste anticorpo e a perda do HBsAg podem ser indicadores úteis da resolução da doença. A deteção de anti-HBs num indivíduo assintomático pode indicar uma exposição anterior ao HBV. Com base na recomendação da OMS, uma concentração anti-HBs ≥ 10 mUI/ml é considerada como sendo protetora contra a infeção pelo vírus da hepatite B. (29)
- **Qualitativa de anticorpos contra o antígeno core (anti-HBc)** – indicador de infeção presente ou passada pelo vírus da hepatite B. São detetados no soro logo após o aparecimento do HBsAg em infeções agudas e persistem após o seu desaparecimento mas antes do aparecimento de anti-HBs. Os resultados com valores $\geq 1,00$, a amostra é reativa e há a necessidade de repetir o teste em duplicado. Por outro lado, amostras com valores $< 1,00$ são não reativas. (30)
- **Qualitativa do antígeno e (HBeAg)** – utilizado para monitorizar o progresso da infeção pelo vírus. É detetável na fase inicial da infeção após o aparecimento do HBsAg. A presença de HBeAg está correlacionada com o grande número de vírus infecciosos. Resultados: valores $< 1,00$ – amostra não reativa; valores $\geq 1,00$, a amostra é reativa e há a necessidade de repetir o teste em duplicado. (31)

- **Qualitativa de anticorpos contra o antígeno e (anti-HBe)** – a seroconversão de HBeAg em anti-HBe durante a infeção aguda é normalmente indicativa da resolução da infeção e de um nível reduzido de infecciosidade. Esta seroconversão também é utilizada como um indicador de resposta virológica no tratamento de doentes com hepatite B crónica. Assim, resultados com valores $\leq 1,00$, a amostra é reativa e há a necessidade de repetir o teste em duplicado. Amostras com valores $>1,00$ são não reativas. (32)

➤ *Serologia Hepatite C*

Nome: Anti-HCV (33)

Finalidade de uso: Detecção qualitativa de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) em soro e plasma humanos, incluindo amostras colhidas após a morte.

Utilizado como meio auxiliar no diagnóstico de infeção pelo HCV, como teste de rastreio para evitar a transmissão de HCV a recetores de sangue, componentes de sangue, células, tecidos e órgãos. A presença de anticorpos anti-HCV indica que um indivíduo pode ter sido infetado pelo HCV, ser portador de HCV infeccioso e/ou pode transmitir infeção pelo HCV.

Constituição dos reagentes:

Revestimento das micropartículas: antígeno do HCV

Conjugado: anticorpos anti-IgG/anti-IgM marcado com acridina

Diluição: Para este ensaio, não podem ser analisadas amostras diluídas.

Resultados: A presença ou ausência de anticorpos anti-HCV na amostra é determinada comparando o valor de quimioluminescência na reação com o valor do cut-off determinado a partir de uma curva de calibração ativa.

- Valores $\geq 1,00$, a amostra é reativa pelo que há a necessidade de repetir o teste em duplicado: se ambos forem não reativos, então a amostra é considerada não reativa para anticorpos-anti-HCV; se um ou ambos os resultados forem reativos, a amostra é considerada repetidamente reativa e deve ser submetida a testes suplementares;
- Amostras com valores $< 1,00$ são consideradas não reativas pelo que não é necessário repetir o teste.

➤ *Serologia HIV*

Nome: HIV Ag/Ac Combo (34)

Finalidade de uso: Detecção qualitativa simultânea do antígeno p24 e de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e/ou tipo 2 (HIV-1/HIV-2) em soro ou plasma humanos, incluindo amostras colhidas após a morte. Os anticorpos são quase sempre detetados em doentes com SIDA e em indivíduos assintomáticos infetados com o HIV. O

antigénio p24 pode ser detetado pouco tempo depois da infeção pelo HIV mas antes da seroconversão.

Este teste é utilizado como meio auxiliar no diagnóstico da infeção, como teste de rastreio para evitar a transmissão viral a recetores de dádivas de sangue, componentes de sangue, células, tecidos e órgãos.

Constituição dos reagentes:

Revestimento das micropartículas: antigénio HIV-1/HIV-2 e de anticorpo monoclonal contra o antigénio p24 do HIV

Conjugados: antigénios recombinantes do HIV-1/HIV-2, de péptidos sintéticos e de anticorpos anti p24 do HIV marcados com acridina

Diluição: Para este ensaio, não podem ser analisadas amostras diluídas.

Resultados: A presença ou ausência de antigénio p24 do HIV ou de anticorpos anti-HIV-1/HIV-2 na amostra é determinada pela comparação com a intensidade do sinal quioluminescente na reação relativamente ao sinal de cut-off, calculado a partir de uma calibração. Importa salientar que um resultado obtido deste ensaio não faz a distinção entre a reatividade ao antigénio p24, a anticorpos anti-HIV-1 ou anti-HIV-2.

- As amostras com valores $\geq 1,00$ são consideradas reativas e devem ser novamente analisadas em duplicado. A repetida reatividade é um forte indicio da presença de anticorpos ou antigénio do HIV. No entanto, estas amostras devem ser submetidas a um ensaio suplementar;
- Amostras com valores $< 1,00$ são consideradas não reativas.

➤ *Serologia Rubéola*

Nome: Rubella IgM e IgG (35,36)

Finalidade de uso: Detecção qualitativa de anticorpos IgM e IgG contra o vírus da rubéola em soro e plasma humanos. Os anticorpos IgM foram detetados 4 a 15 dias após o aparecimento do exantema e começam a diminuir após 36 a 70 dias. Este tipo de anticorpos também podem ser observados após reinfeção mas em níveis baixos.

Este teste é utilizado para diagnóstico em grávidas e em outros indivíduos.

Constituição dos reagentes:

Tabela 13 - Constituição dos reagentes para deteção de anticorpos IgM e IgG do vírus da rubéola

	IgM (35)	IgG (36)
<u>Revestimento das micropartículas</u>	Vírus da Rubéola	
<u>Conjugado</u>	Anticorpos anti-IgM humana marcado com acridina	Anticorpos anti-IgG humana marcada com acridina

Diluição: Para ensaio IgM, não podem ser analisadas amostras diluídas. Relativamente a rubéola IgG, amostras com concentrações > 500,0 UI/mL de anticorpos IgG podem ser diluídas de forma automatizada ou manual (1:10).

Resultados: A presença ou ausência de anticorpos IgM e IgG na amostra é determinada pela comparação o valor de quimioluminescência na reação com o valor do cut-off, calculado a partir de uma calibração.

Para **anticorpos IgM** (35):

- Um valor de amostra $\geq 1,60$ índice é considerado reativa;
- Amostras com um valor entre 1,20 e 1,60 são consideradas em zona cinzenta;
- Valores < 1,20 é considerada não reativa.

A reatividade para anticorpos IgM contra o vírus da rubéola pode indicar infeção atual, reativação ou vacinação recente. Recomenda-se a confirmação dos resultados das amostras com valores índice $\geq 1,20$ e < 1,60 através da realização de testes Rubéola IgG. Deve ser considerada a colheita de uma segunda amostra, se possível, dentro de um período de tempo apropriado (por exemplo, 2 semanas) para confirmar os níveis de IgM e IgG.

Para **anticorpos IgG** (36):

- Um valor de amostra ≥ 10 UI/mL é considerado reativa. A presença de pelo menos 10 UI/mL de amostra é indicativa de exposição passada ao vírus da rubéola. Níveis de anticorpos abaixo de 10 UI/mL podem ser insuficientes para fornecer proteção contra doenças clínicas após exposição ao vírus da rubéola;
- Amostras com um valor entre 5,00 e 9,9 UI/mL são consideradas em zona cinzenta;
- Amostras com valores < 4,9 UI/mL são consideradas não reativas.

➤ *Serologia Toxoplasmose*

Nome: Toxo IgM e IgG (37,38)

Finalidade de uso: Detecção qualitativa de anticorpos IgM e quantitativa de anticorpos IgG contra *Toxoplasma gondii* em soro e plasma humanos. A presença de anticorpos IgG indica que ocorreu infeção mas não distingue se essa infeção é recente ou passada. Os anticorpos IgM são detetados em indivíduos que contraíram a infeção, mas esses anticorpos podem persistir durante um período máximo de 18 meses após a infeção.

Constituição dos reagentes:Tabela 14 - Constituição dos reagentes para deteção de anticorpos IgM e IgG contra *Toxoplasma gondii*

	IgM (37)	IgG (38)
<u>Revestimento das micropartículas</u>	Anticorpos anti-IgM humana	Antigénio de <i>Toxoplasma gondii</i> recombinante (contêm antigénio p30 e p35)
<u>Conjugado</u>	Anticorpos contra o antigénio p30 do <i>Toxoplasma gondii</i> marcado com acridina	Anticorpos anti-IgG humana marcada com acridina

Diluição: Para o ensaio Toxo IgM, não podem ser analisadas amostras diluídas. Para o ensaio Toxo IgG, amostras com uma concentração superior a 200,0 UI/ml são diluídas automaticamente (1:10).

Resultados: A presença ou ausência de anticorpos IgM e IgG anti-toxo na amostra é determinada pela comparação com o valor de quioluminescência na reação com o valor do cut-off, calculado a partir de uma calibração.

Para **anticorpos IgM (37):**

- Um índice $\geq 0,60$, significa que a amostra é reativa;
- Um índice entre 0,50 e 0,60, significa que a amostra se encontra na zona cinzenta e recomenda-se a colheita de uma 2ª amostra dentro de um período de tempo razoável para repetir o ensaio;
- Um índice $< 0,50$, significa que a amostra é não reativa.

Para **anticorpos IgG (38):**

- Valores $\geq 3,0$ são consideradas amostras reativas e indicam infeção passada ou aguda;
- Valores com concentração entre 1,6 e 3,0, encontram-se na zona cinzenta. Recomenda-se a análise com um ensaio Toxo IgM e/ou a colheita de uma 2ª amostra dentro de um período de tempo razoável para repetição do ensaio Toxo IgG;
- Valores com concentração (UI/ml) $< 1,6$, a amostra é não reativa. Os doentes com estes resultados mas com suspeita de fase inicial da doença devem repetir passado 3 semanas.

Para distinguir entre infeção recente e passada, as amostras positivas para anticorpos IgM e IgG devem ser analisadas com testes de avidéz da IgG. Um índice elevado de avidéz é um forte indício de que a infeção ocorreu há mais de 4 meses. Resultados baixos de testes de avidéz não podem ser utilizados no diagnóstico de toxoplasmose aguda.

➤ *Citomegalovírus (CMV)*

Nome: CMV IgM e IgG (39,40)

Finalidade de uso: Detecção qualitativa de anticorpos IgM e IgG contra o citomegalovírus em soro e plasma humanos.

Uma infeção reincidente com o vírus ou a reativação do vírus latente pode originar a presença de anticorpos IgM anti-CMV na ausência de infeção primária pelo CMV. Embora a presença de anticorpos IgG anti-CMV reduza a probabilidade de complicações relacionadas com o CMV, esta não garante uma proteção total contra a doença.

Constituição dos reagentes:

Tabela 15 - Constituição dos reagentes para deteção de anticorpos IgM e IgG contra o CMV

	IgM (39)	IgG (40)
<u>Revestimento das micropartículas</u>	Lisado viral de CMV e de antígeno recombinante do CMV	Lisado viral de CMV
<u>Conjugado</u>	Anticorpos anti-IgM humana marcados com acridina	Anticorpos anti-IgG humana marcados com acridina

Diluição: Para o ensaio CMV IgM, não podem ser analisadas amostras diluídas. Para o ensaio CMV IgG, amostras com uma concentração superior a 250,0 UA/ml são diluídas automaticamente (1:10).

Resultados: A presença ou ausência de anticorpos IgM e IgG anti-CMV na amostra é determinada pela comparação o valor de quimioluminescência na reação com o valor do cut-off, calculado a partir de uma calibração.

Para **anticorpos IgM (39):**

- Um índice $\geq 1,00$, significa que a amostra é reativa para anticorpos IgM anti-CMV e indicam infeção aguda;
- Um índice $< 0,85$, significa que a amostra é não reativa. Indica ausência de infeção aguda.

Para **anticorpos IgG (40):**

- Valores com concentração $\geq 6,0$ UA/mL, são consideradas amostras reativas. Indicam uma infeção passada ou aguda;
- Valores com concentração $< 6,0$ UA/mL, a amostra é não reativa. Presume-se que os indivíduos com estes resultados não estejam infetados com CMV e sejam suscetíveis a infeção primária.

Se for necessário excluir a infeção primária, as amostras reativas para anticorpos IgG anti-CMV devem ser analisadas com os testes de avidéz. Um resultado positivo para anticorpos

IgM em conjunto com um resultado de avidéz baixa é um forte indicador de infeção primária por CMV nos últimos 4 meses.

Ainda na parte da imunologia, existem outros marcadores tumorais que são feitos no equipamento Unicel DXI 800, da Beckman Coulter.

D.3.2. Equipamento Unicel DXI 800



Figura 12 - Equipamento Unicel DXI 800 da Beckman Coulter – Foto da autora

O equipamento Unicel DXI 800 da Beckman Coulter é utilizado, não só para os marcadores tumorais, como também para análises a hormonas (como é o caso da hormona luteínica, hormona estimulante folicular, progesterona, estradiol, tiroxina, entre outros), vitaminas (B12, D) e alguns anticorpos.

Métodos de Determinação

Este equipamento, utiliza como método de determinação imunoensaios quimioluminescentes de partículas paramagnéticas para a determinação quantitativa no soro humano.

Parâmetros analisados

Os marcadores tumorais mais pedidos e executados neste equipamento são:

- **Antigénio Carcinoembrionário (CEA)** (41) - Usado como um auxílio na monitorização de pacientes com cancro, especialmente o cancro colorretal, quanto à progressão, regressão ou recorrência do cancro após o tratamento. Uma elevação persistente do CEA após terapêutica ou intervenção cirúrgica sinaliza doença residual ou recorrência, enquanto a diminuição dos níveis para dentro da faixa normal é indicativo de intervenção bem sucedida. O CEA também está elevado no soro de

pacientes com doenças não malignas e em fumantes inveterados, portanto o CEA deve não deve ser utilizado no diagnóstico de cancro ou no rastreamento de pacientes assintomáticos.

É um ensaio imunoenzimático “sanduíche” que utiliza dois anticorpos monoclonais anti-CEA de rato que reagem com diferentes epítomos de CEA. A amostra é adicionada a um recipiente de reação, juntamente com o primeiro conjugado anti-CEA ligado a fosfatase alcalina e o segundo anti-CEA ligado a partículas paramagnéticas. Após incubação, são realizadas a separação magnética e a lavagem. Em seguida, o substrato quimioluminescente é adicionado ao recipiente e a luz gerada pela reação é medida com um luminómetro. A produção de luz é proporcional à concentração de CEA na amostra.

Diluição: valores > 1,000 ng/mL, é necessário uma diluição manual na proporção de 1:9. Após executar o ensaio com a amostra diluída, tem que se multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição.

Resultados: Os resultados dos testes dos pacientes são determinados automaticamente pelo software do sistema usando um modelo matemático logístico ponderado de quatro parâmetros. A quantidade de analito na amostra é determinada a partir de uma curva de calibração multiponto armazenada no sistema. O valor de referência para a maioria dos indivíduos saudáveis é < 3.0 ng/ml.

- **Antigénio Específico da Próstata (PSA) (42,43)** - indicado para a medição do PSA sérico em conjunto com o toque retal como auxílio na deteção de cancro da próstata em homens a partir dos 50 anos de idade. Importa salientar que a biópsia da próstata é necessária para o diagnóstico de cancro. Este ensaio também é indicado para a medição em série do PSA para auxiliar no prognóstico e no tratamento de doentes com cancro da próstata. O PSA livre pode ser usado para determinar o risco relativo de cancro da próstata em homens individuais.

O princípio do teste, quer para PSA livre e total é um ensaio imunoenzimático de local duplo (“sanduíche”). A amostra é adicionada a um recipiente de reação contendo conjugado anticorpo monoclonal de rato anti-PSA – fosfatase alcalina e partículas paramagnéticas revestidas com um segundo anticorpo monoclonal de rato anti-PSA. O PSA contido na amostra liga-se ao anticorpo monoclonal anti-PSA imobilizado na fase sólida e, simultaneamente, o conjugado anticorpo monoclonal anti-PSA – fosfatase alcalina reage com um local antigénico diferente no PSA da amostra. Após a incubação num recipiente de reação, os materiais ligados à fase sólida são retidos num campo magnético enquanto os materiais não ligados são removidos por lavagem. De seguida, o substrato quimioluminescente é adicionado ao recipiente e a luz gerada

pela reação é medida com um luminómetro. A produção de luz é diretamente proporcional à concentração de PSA na amostra.

Diluição: A funcionalidade de diluição no aparelho do sistema Dxl automatiza o processo de diluição, utilizando uma proporção 4:9, quando uma amostra contém uma quantidade superior ao limite de deteção (20 ng/mL). O sistema comunica os resultados ajustados para a diluição.

Resultados: A quantidade de analito na amostra é determinada a partir da produção de luz medida através dos dados de calibração armazenados no sistema.

Concentrações elevadas de PSA total ou um nível reduzido de PSA livre percentual pode ser observado no soro de doentes com distúrbios não malignos, assim como no soro de indivíduos com cancro da próstata. Além disso, concentrações baixas de PSA total ou valores elevados de PSA livre percentual não indica necessariamente a ausência de cancro. Assim, as concentrações de PSA total e PSA livre devem ser doseadas em simultâneo na mesma amostra sérica e utilizadas para calcular a percentagem de PSA livre da seguinte forma: $\text{PSA livre (ng/mL)} / \text{PSA total (ng/mL)} \times 100 = \% \text{ de PSA livre}$.

A maioria dos homens saudáveis têm concentrações de PSA $\leq 4,0$ ng/mL. Indivíduos com idade entre 50 e 75 anos, com valores de PSA no soro entre 4 e 10 ng/mL e com resultados do exame do toque retal sem suspeitas de cancro, representam a “zona cinzenta de diagnóstico”, na qual o PSA total identificou os indivíduos com alto risco. Relativamente ao PSA livre, um cut-off acima de 25% indica menor risco de cancro da próstata.

- **Antigénio carboidrato 19-9 (CA 19-9)** (44) – destina-se ao prognóstico e monitorização do cancro pancreático na população em geral. Pode ser observado em tumores sintetizados pelas células pancreáticas e dos ductos biliares de indivíduos saudáveis, assim como pelos epitélios gástrico, colónico, endometrial e salivar. O teste de doseamento do CA 19-9 é um ensaio imunoenzimático de local duplo (“sanduíche”). Uma amostra é adicionada a um recipiente de reação juntamente com as partículas paramagnéticas revestidas com um anticorpo policlonal de cabra antibiotina e o conjugado anticorpo monoclonal de rato – biotina. Após a incubação num recipiente de reacção, os materiais ligados à fase sólida são retidos num campo magnético enquanto os materiais não ligados são removidos por lavagem. De seguida, o substrato quimioluminescente é adicionado ao recipiente e a luz gerada pela reação é medida com um luminómetro. A produção de luz é directamente proporcional à concentração de antigénio CA 19-9 na amostra.

Diluição: Neste ensaio, é necessário uma diluição quando existem valores superiores ao limite de deteção 2000 U/mL (1:9).

Resultados: A quantidade de analito presente na amostra é determinada a partir duma curva de calibração multiponto armazenada no sistema.

Em geral, apenas uma pequena quantidade do antigénio CA 19-9 está presente no sangue de indivíduos saudáveis ou indivíduos com distúrbios benignos (< 35 U/mL).

Para além destes marcadores tumorais, neste equipamento são doseados:

- **Anticorpos Anti-Tiroglobulina (ATG) e Anti-tiroperoxidase (ATPO) (45,46):** Ambos os testes são ensaios imunoenzimáticos quimioluminescentes sequenciais de duas etapas (“sanduíche”). A amostra é adicionada a um recipiente de reação contendo partículas paramagnéticas revestidas com tiroglobulina e tireoperoxidase, respetivamente, fazendo com que os anticorpos se liguem. Após a incubação num recipiente de reação, os materiais ligados à fase sólida são retidos num campo magnético enquanto que os materiais não ligados são removidos por lavagem. Adiciona-se depois o conjugado que se liga aos anticorpos a dosear e é feita uma segunda incubação. De seguida, o substrato quimioluminescente é adicionado e a luz gerada pela reação é medida com um luminómetro. A produção de luz é diretamente proporcional à concentração de anticorpos anti-tiroglobulina e anti-tireoperoxidase na amostra.

Diluição: Para os anticorpos anti-tiroglobulina, não é necessário efetuar uma diluição. No entanto, para os anticorpos anti-tireoperoxidase, valores acima de 1000 IU/mL é necessária uma diluição, sendo que esta é feita automaticamente pelo equipamento.

Resultados: A quantidade de anticorpos presentes na amostra é determinada a partir de uma curva de calibração multiponto armazenada no sistema. O intervalo de referência, para indivíduos sem patologia tiroideia são abaixo dos 4.0 IU/mL de anticorpos anti-tiroglobulina e abaixo de 9.0 IU/mL de anticorpos antitireoperoxidase. O doseamento destes anticorpos têm como utilidade clínica o diagnóstico de doenças autoimunes na tiróide como é o caso de tireoidite de Hashimoto e doença de Graves. A ausência destes anticorpos são uma forte evidência da ausência de doença autoimune.

D.3.3. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O requisito de controlo de qualidade recomendado é a análise de uma única amostra de cada nível de controlo uma vez a cada 24 horas, cada dia de utilização.

D.3.4. Calibração

Uma vez aceite e armazenada uma calibração de cada ensaio com o respetivo calibrador, todas as amostras posteriores poderão ser analisadas sem outra calibração a menos que: seja utilizado um kit de reagentes com um novo número de lote, os controlos se situem fora dos intervalos ou após manutenções corretivas ou preventivas que afetem a calibração. Para avaliar a calibração do ensaio, tem de ser analisada uma amostra de cada um dos níveis dos controlos e assegurar que os valores de controlo do ensaio se situam dentro dos intervalos especificados.

D.3.5. Processamento da Amostra

Após a colheita, as amostras são centrifugadas. Quando são colocadas nos equipamentos, deve-se verificar que existe a quantidade de amostra suficiente e em boas condições para evitar erros nos resultados.

D.3.6. Interferências

Existem algumas interferências relativas à determinação destes marcadores tumorais, como é o caso de (41–44):

- Amostras inativadas termicamente, demasiado hemolisadas, com contaminação microbiana visível ou presença de fibrina podem provocar resultados erróneos. Para além disso, antes da análise, deve-se eliminar as bolhas com uma vareta;
- Amostras de doentes que receberam preparações de anticorpos monoclonais de rato para fins de diagnóstico ou terapêutica podem conter anticorpos humanos antirrato (HAMA), o que pode levar a valores anómalos;
- Os anticorpos heterofílicos presentes no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas do reagente interferindo com os imunoensaios *in vitro*. Os doentes frequentemente em contacto com os animais ou expostos a produtos séricos animais podem ser propensos a esta interferência e levar a valores anómalos.

Os resultados devem ser interpretados baseando-se no quadro clínico geral do doente incluindo: sintomas, anamnese clínica, dados de outros testes e outras informações apropriadas. Nunca devem ser tidos em conta os resultados destes ensaios, isoladamente.

Controlo de Qualidade (47)

O Controlo da Qualidade no laboratório é um processo estatístico que monitoriza e avalia os processos analíticos pela análise dos resultados de amostras de controlo da qualidade. Assim, estão presentes dois conceitos diferentes, mas complementares – Controlo de Qualidade Interno (CQI) e Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).

O controlo interno e externo da qualidade tem como objetivo analisar e monitorizar continuamente os parâmetros de precisão e exatidão dos métodos implementados no laboratório, de forma a assegurar que, em qualquer momento, os resultados apresentam níveis de qualidade compatíveis com a utilização clínica desejada, garantindo o resultado correto do utente.

Controlo de qualidade Interno (CQI)

O CQI realiza-se no laboratório conjuntamente com os doseamentos dos analitos nas amostras dos utentes de forma a saber e avaliar se o sistema analítico está a funcionar em perfeitas condições e em função dos limites de tolerância pré-estabelecidos. Ou seja, a principal função é identificar qualquer anomalia de funcionamento do sistema analítico, em tempo real, a fim de prevenir a emissão de resultados inexatos. Para além disso, permite construir as cartas de controlo diárias e, ao longo do tempo, fornece dados necessários para a determinação da incerteza e do cálculo do erro.

O laboratório utiliza o programa informático Controllab, que proporciona ferramentas para monitorização em tempo real. O critério para avaliação dos controlos baseia-se nas cartas de controlo através da aplicação da regra 1_{3s} , que significa que os resultados devem ser rejeitados quando o valor de um dos controlos excede o limite de mais ou menos 3 desvios-padrão. A aplicação desta regra tem como objetivo a utilização de um critério de aceitação/rejeição de resultados com base no desempenho do método nas instalações e condições características do LFG. Na maioria das situações, a aplicação desta regra conduz a um estreitamento dos limites de aceitação, em relação aos limites recomendados pelo fabricante do método. Quando tal não acontece, aplicam-se os limites definidos pelo fabricante.

Em paralelo com a utilização de critérios baseados nos valores obtidos para os controlos, é efetuada uma análise de tendência dos resultados obtidos nas amostras e resultados obtidos pelo mesmo equipamento, de forma a detetar desvios sistemáticos dos resultados ou alterações da precisão dos métodos.

No início e no final de cada sequência de análises, são introduzidos um ou mais controlos de forma a comprovar a estabilidade do método ao longo do tempo. Se o primeiro controlo é não conforme, não são iniciados os trabalhos até à implementação das ações

adequadas. Após a implementação destas ações é efetuado um novo controlo. Se os controlos forem aceites, a corrida analítica é aceite podendo assim validar os resultados e emitir os respetivos boletins. Se o controlo de final de sequência é não conforme os resultados não são aceites até à implementação das ações adequadas. Se a causa da não conformidade não reside no controlo utilizado, todos os resultados dessa sequência devem ser rejeitados.

Perante um resultado não conforme, o LFG pode tomar várias medidas, onde se incluem: calibração de aparelhos/instrumentação, verificação dos reagentes (exemplo: deterioração, bolhas de ar), rejeição de lotes de reagentes, rejeição de kits analíticos, repetição do controlo ou apurar outras possíveis causas.

São executados novos controlos após a calibração e conforme indicado após procedimentos de manutenção específicos para confirmar se o sistema está a funcionar corretamente.

Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

Corresponde à avaliação, por um organismo externo, da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório. Ou seja, avalia “à posteriori” a exatidão do método e dos resultados, contribui para a fiabilidade dos mesmos, avalia a coerência dos resultados interlaboratoriais e evidencia não conformidades que poderão originar correções, ações corretivas ou preventivas.

Existem diferentes programas fornecidos pelas entidades, sendo a maior parte dos parâmetros controlados pela Controllab. As restantes entidades utilizadas foram discriminadas ao longo do trabalho. Importa salientar que para alguns parâmetros não existem programas de AEQ. Assim sendo, o laboratório serve-se das cartas de controlo interno (CQI) para o cálculo do BIAS, que quantifica o desvio do valor médio de um conjunto de determinações em relação ao valor correto.

Os relatórios de AEQ são devidamente analisados de forma a detetar situações não conformes ou tendências de resultados. Assim, são calculados semestral/anualmente, através da folha de cálculo, os seguintes valores: Erro Total, Sigma e Incerteza da medição.

PARTE II

Monografia

***A BIOQUÍMICA CLÍNICA NO ACOMPANHAMENTO DA GRÁVIDA:
FUNÇÃO HEPÁTICA E PATOLOGIAS ASSOCIADAS***

Introdução

A Bioquímica Clínica tem um papel importante na monitorização da mulher grávida pois, ao longo deste período, existem alguns parâmetros laboratoriais que sofrem alterações e, embora possam ser o reflexo de diferentes aspetos fisiológicos, também podem refletir uma situação patológica.

Relativamente à função hepática durante a gravidez, podem ser observadas alterações mais ou menos graves que podem ter diferentes causas: uma doença hepática específica da gravidez, a uma doença hepática pré-existente previamente, não reconhecida, ou a doenças hepáticas que se apresentam coincidentemente numa mulher grávida.

As doenças hepáticas específicas da gravidez abordadas na presente monografia são a colestase intra-hepática (ICP) e a síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, plaquetas baixas), patologias que estão associadas a riscos, tanto para a grávida, como para o seu feto/bebé. É assim fundamental um diagnóstico rápido e uma avaliação clínica, de forma a garantir os cuidados adequados para que os riscos sejam minimizados.

A. A mulher grávida

A.1. Exames e testes laboratoriais

Para um cuidado de saúde ideal durante a gravidez, a mulher deve consultar o seu médico antes da conceção. A avaliação pré-concepcional deve incluir uma avaliação médica, reprodutiva e história familiar, exame físico e exames laboratoriais como hemograma completo, tipo sanguíneo e compatibilidade Rh, triagem de anticorpos eritrocitários, esfregaço de Papanicolau, exame de urina, título de rubéola, teste rápido de sífilis, teste de DNA de *Chlamydia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoeae*, teste de portadores de fibrose cística, níveis de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e níveis de antigénio de superfície da hepatite B. (48) Alguns destes testes devem ser repetidos ao longo da gestação para que haja um controlo rigoroso e preciso. Os exames laboratoriais que são requisitados no decurso das consultas de vigilância da gravidez têm como objetivo rastrear, prevenir ou tratar situações passíveis de colocar em risco a saúde materna e/ou fetal ou perinatal. Na figura 13, encontram-se apresentados os exames laboratoriais que devem ser feitos ao longo da gestação, de acordo com a Direção Geral de Saúde (DGS). (49)

1º Trimestre	
<13 semanas	
1. Citologia cervical - Conforme recomendações do Plano Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Oncológicas 2007-2010 para as mulheres não grávidas	
2. Tipagem ABO e fator Rh	8. Serologia Toxoplasmose - IgG e IgM (se desconhecido ou não imune em consulta preconcepcional)
3. Pesquisa de aglutininas irregulares (teste de Coombs indireto)	9. Ac VIH 1 e 2
4. Hemograma completo	10. AgHBs
5. Glicémia em jejum	11. Urocultura com eventual TSA
6. VDRL	
7. Serologia Rubéola - IgG e IgM (se desconhecido ou não imune em consulta preconcepcional)	
2º Trimestre	
18-20 semanas	
12. Serologia Rubéola (IgG e IgM, nas mulheres não imunes)	
24-28 semanas	
13. Hemograma completo	16. Pesquisa de aglutininas irregulares (teste de Coombs indireto)
14. PTGO c/ 75g (colheita às 0h, 1h e 2 horas)	
15. Serologia Toxoplasmose - IgG e IgM (não imunes)	
3º Trimestre	
32 -34 Semanas	
17. Hemograma completo	20. Ac. VIH 1 e 2
18. VDRL	21. AgHBs (as grávidas não vacinadas e cujo rastreio foi negativo no 1º trimestre)
19. Serologia Toxoplasmose - IgG e IgM (nas mulheres não imunes)	
35-37 Semanas	
22. Colheita (1/3 externo da vagina e ano-retal) para pesquisa de <i>streptococcus</i> β hemolítico do grupo B	

Figura 13 - Exames laboratoriais que devem ser realizados nos respetivos períodos ao longo da gestação, de acordo com a DGS (49)

Dependendo dos riscos demográficos, também devem ser oferecidos testes genéticos para doenças como a de Tay-Sachs, anemia falciforme e talassémias. (48)

Assim, muitos testes laboratoriais são úteis para controlar gestações normais e anormais. A triagem de defeitos do tubo neural fetal e aneuploidia deve ser oferecida a todas as grávidas. Por outro lado, a observação materna e registo de movimentos fetais, exame ultrassonográfico (perfil biofísico) e padrões de frequência cardíaca fetal são os métodos atualmente aceites para monitorizar o bem-estar fetal. Embora a maioria das gestações progrida sem problemas, podem surgir complicações na mãe, placenta ou feto. A saúde da mãe e o bem-estar do seu feto estão entrelaçados, cada um afetando o outro, pelo que a gestão da gravidez deve considerar ambos. (48)

A.2. Desenvolvimento da gravidez

A gravidez humana normal dura aproximadamente 40 semanas, medida a partir do primeiro dia do último período menstrual. A gravidez pode ser dividida em quatro intervalos de tempo: os primeiros três períodos são chamados trimestres, cada um dos quais com aproximadamente 13 semanas. O último intervalo de tempo, das 37 às 42 semanas, é designado por termo. Recentemente, a definição de gravidez a termo foi subdividida em: termo precoce (37 a 38 semanas e 6 dias), termo completo (39 a 40 semanas e 6 dias) e termo tardio (41 a 41 semanas e 6 dias). (48)

Quando a concepção ocorre, o óvulo é fertilizado, geralmente na trompa de falópio, converte-se no *zigoto*, sendo este, posteriormente, transportado para o útero com o auxílio da própria contratilidade da parede muscular da trompa. O zigoto divide-se por clivagem ou segmentação e origina a *mórula*. Enquanto as clivagens continuam, a *mórula* desenvolve uma cavidade, o primitivo saco vitelino, torna-se no *blastocisto*, que se implanta na parede uterina cerca de 5 dias após a fertilização. As células da parede exterior do blastocisto, os trofoblastos, invadem sinergicamente o endométrio uterino e desenvolvem vilosidades coriônicas, criando a placenta. (48,50)

O produto da concepção é referido como *embrião* que é alimentado pela placenta e protegido pelo líquido amniótico contra possíveis agressões e que, para além disso, ajuda a manter uma temperatura constante, sendo inalado e engolido pelo embrião durante o desenvolvimento normal do pulmão fetal. Este fluído é um meio dinâmico cujo volume e composição química são controladas dentro de limites relativamente estreitos. O embrião sofre divisão celular, diferenciação e crescimento e, através de combinações de três tipos de células primárias (ectoderme, mesoderme e endoderme), os órgãos começam a ser formados, num processo chamado organogénese. Com cerca de 10 semanas, o embrião desenvolveu a maioria das estruturas principais e é designado como feto. (48)

A.3. Placenta

A placenta humana é morfológica, bioquímica e funcionalmente uma unidade biológica bem definida e eficiente, exercendo, durante a gestação, funções que, no indivíduo adulto, são da responsabilidade de órgãos como o rim, fígado e pulmão. Sofre constantes alterações e remodelações ao longo da gestação, com profundas variações de morfologia e capacidade funcional. (50) É composta por grandes vasos fetais, as vilosidades, que são projeções que se inserem nos espaços intervilosos. Cada espaço interviloso contém sangue materno que banha as vilosidades fetais e facilita a troca bidirecional entre mãe e feto. (48)

A placenta tem diversas funções, como manter separados os sistemas de circulação materna e fetal, nutrir o feto (transporte de oxigénio, glicose, cálcio e outros nutrientes), eliminar resíduos (dióxido de carbono, ureia e outros catabólitos) e produzir hormonas vitais para a gravidez. Para que as substâncias passem da circulação materna para a circulação fetal, devem atravessar duas camadas celulares: o espaço interviloso e os capilares das vilosidades. Assim, a transferência de qualquer substância depende em grande parte do gradiente de concentração entre o sistema circulatório materno e fetal, da presença ou ausência de proteínas de ligação circulantes, da lipossolubilidade da substância e da presença de transporte facilitado, como bombas iónicas ou endocitose mediada por recetor, como é o caso da imunoglobulina G (IgG) materna. (48,50) Devido à sua semivida prolongada, a IgG produzida pela mãe protege o recém-nascido, através da imunidade passiva, durante os primeiros 6 meses de vida. (48)

A placenta pode ajudar a proteger o feto contra certas moléculas xenobióticas, infeções e doenças maternas. (51) Para além disso, transfere hidrogeniões, bicarbonato e ácido láctico, pelo que, em situações normais, o estado ácido-base materno-fetal é muito aproximado; esta transferência é, contudo, relativamente lenta. Durante o trabalho de parto, o organismo materno apresenta, em geral, uma ligeira acidose, mas o feto, usando os seus próprios sistemas-tampão, não é afetado por este estado. No entanto, se a acidose materna se agrava (desidratação, cetoacidose, etc), a capacidade de resposta fetal esgota-se, podendo assistir-se a uma acidose metabólica fetal de causa materna. (50)

A placenta também liberta hormonas nas circulações materna e fetal que afetam a gravidez, o metabolismo e crescimento fetal, e o parto entre outras funções. (51) Produz várias hormonas proteicas, sendo as principais a gonadotrofina coriónica humana (hCG) e a lactogénica-placentária humana (hPL) e hormonas esteroides, que incluem a progesterona e os estrogénios: estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3). (48)

A.4. Alterações fisiológicas gerais

Logo nas primeiras semanas após a concepção, observam-se profundas alterações anatómicas e fisiológicas no organismo da mulher. Algumas dessas modificações aparecem antes das necessidades fetais o justificarem, como é o caso do aumento do volume mamário, e outras vão-se estabelecendo à medida que o desenvolvimento fetal progride. É imprescindível um conhecimento detalhado dos ajustamentos fisiológicos dos diferentes aparelhos e sistemas da mulher grávida, para que seja possível distinguir, tanto em clínica como em laboratório, o que é normal do que é patológico. (50)

Ao longo da gestação existem alterações fisiológicas visíveis laboratorialmente, a diferentes níveis. Indicam-se algumas das mais importantes para, num item separado dar-se maior relevo à função hepática e a duas das patologias que lhe podem estar associadas.

A.4.1. Hematopoiese

Embora se verifique um aumento da eritropoiese, a concentração de hemoglobina e o hematócrito diminuem, produzindo a chamada anemia fisiológica da gravidez. (48) A entrada em circulação de muitos eritrócitos jovens provoca um discreto aumento do volume globular médio e um certo grau de anisocitose. O número de reticulócitos também se encontra aumentado. A estas modificações associa-se, habitualmente, uma diminuição da sideremia devido à hemodiluição e aumento da capacidade de fixação do ferro, assemelhando-se este quadro ao encontrado nas anemias ferropénicas. (50)

Relativamente à contagem das plaquetas, verifica-se uma ligeira diminuição, provavelmente devido à hemodiluição e ao aumento do seu consumo, mas mantém-se dentro da variação normal do estado não gravídico ou, por vezes, ligeiramente abaixo das 150000/mm³. Para além disso, a vida média das plaquetas diminui um pouco durante a gestação, mas o lançamento em circulação de plaquetas jovens e a ativação plaquetária estão ligeiramente aumentadas. É habitual assistir-se ao aparecimento de uma moderada leucocitose nos 2º e 3º trimestres principalmente à custa de um aumento dos granulócitos neutrófilos. (50) Durante o trabalho de parto e puerpério (o intervalo imediatamente após o parto), a contagem de leucócitos pode aumentar acentuadamente. (48)

A.4.2. Hemostase

Assiste-se ao aumento da produção de fatores da coagulação pelo fígado, principalmente do fibrinogénio, de onde resulta maior formação de fibrina que se deposita nas paredes dos vasos uteroplacentários, sendo que a fibrinólise está diminuída. Estas modificações, análogas ao de um estado de hipercoaguabilidade, terão um papel de prevenção das hemorragias pós-parto. A produção de prostaciclina pelo endotélio vascular

impede a agregação plaquetária e destrói os agregados de plaquetas já formados. A funcionalidade das plaquetas assegura a reparação de pequenas fissuras da parede vascular, enquanto a prostaciclina evita, na gravidez normal, que esse processo degenera na formação de trombos. (50)

Além do fibrinogénio, praticamente todos os outros fatores de coagulação estão alterados em maior ou menor grau durante a gestação (figura 14).(48,50) Os mecanismos intrínseco e extrínseco da coagulação, expressos, respetivamente, TTPa e pelo TP, mantêm-se dentro dos limites normais do adulto, com tendência para uma ligeira diminuição. (50)

Fibrinogénio (fator I)	↑↑↑
Proconvertina (fator VII)	↑↑↑
Fator anti-hemofílico (fator VIII)	↑↑↑
Componente tromboplastínico plasmático (fator IX)	↑↑↑
Fator de Stuart (fator IX)	↑↑↑
Protrombina (fator II)	↑
Antecedente tromboplastínico do plasma (fator XI)	↓
Fator estabilizador da fibrina (fator XIII)	↓
APTT	↓
Tempo de protrombina	↓

Figura 14 - Alterações da coagulação na gravidez (50)

A.4.3. Função renal

A filtração glomerular aumenta nas primeiras semanas da gravidez mantendo-se estável até ao fim, o que leva a uma maior excreção dos produtos finais do metabolismo, como a ureia, creatinina e ácido úrico, cujas concentrações plasmáticas diminuem simultaneamente. O aumento da filtração glomerular, nem sempre acompanhada por uma reabsorção tubular suficiente, leva a eliminação de certos nutrientes. A glicose, por exemplo, sofre uma marcada redução no seu limiar de excreção renal, por incapacidade de reabsorção ao nível do túbulo coletor e ansa de Henle, pelo que o aparecimento de glicosúria é relativamente comum nas grávidas. (50)

Alguns aminoácidos sofrem um aumento da sua excreção ao longo de toda a gravidez (alanina e histidina, por exemplo) enquanto outros têm excreção aumentada no início e diminuída na segunda metade da gravidez (cistina, fenilalanina, leucina, etc). Também se verifica um aumento da excreção das vitaminas B12 e C e, principalmente, de folato. (50)

A albumina sérica diminui na gravidez e acredita-se que esteja relacionada com o aumento do volume plasmático total como resultado da hemodiluição. (50,52,53) A albumina pode aparecer na urina em pequenas quantidades, mas, na gravidez normal, a proteinúria total raramente excede os 150 mg/dia, considerando-se que valores superiores ou iguais a 300 mg/dia correspondem a situações patológicas.(50)

B. Função hepática

Durante a gravidez, a função hepática regista diversas alterações que podem ser fisiológicas ou patológicas.

B.1. Alterações na função hepática

Normalmente, observam-se alterações fisiológicas no perfil bioquímico do fígado durante a gravidez. Na prática clínica, existem quatro enzimas hepáticas de interesse: AST e ALT, como marcadores de dano hepatocelular, ALP e GGT sugestivas de colestase. A sobreposição entre estas duas classes de testes da função hepática é muito comum. A bilirrubina é capaz de avaliar a função do sistema biliar (ductos biliares intra e extra-hepáticos e vesícula biliar). Qualquer alteração observada nas 4 enzimas hepáticas e na bilirrubina necessita de uma avaliação mais aprofundada. Os parâmetros que avaliam a função sintética do fígado são a albumina e o INR. (52)

Em geral, as concentrações das aminotransferases, bilirrubina e GGT permanecem normais durante toda gravidez. (52,54) A ALP aumenta e pode atingir 2 a 4 vezes o valor de referência superior normal do adulto, estando relacionado com a produção da isoenzima placentária e desenvolvimento ósseo fetal. Assim, as mulheres grávidas com ALP elevada isolada, nesta ordem de grandeza, não precisam de investigação adicional. (50,52,54,55) Após o nascimento, o nível de ALP cai, atingindo valores normais em 2 semanas. (52)

Devido ao aumento das hormonas da gravidez, as concentrações plasmáticas absolutas de cortisol total e livre são várias vezes superiores. Isto acontece porque o estrogénio estimula o aumento da produção hepática de globulina de ligação ao cortisol, fazendo com que a depuração deste seja diminuída. O ritmo diurno de cortisol, mais alto pela manhã e mais baixo à noite, é mantido. Para além disso, verifica-se um aumento de aproximadamente 40% no colesterol e ácidos gordos livres e, ao longo da gestação, os triglicéridos aumentam cerca de 3 vezes. (48) O nível de alfa-fetoproteína (AFP) aumenta durante a gravidez à medida que é produzida pelo fígado fetal (55), embora este parâmetro seja, também, utilizado como marcador de algumas anomalias congénitas, como espinha bífida e anencefalia, por exemplo.

Importa salientar que a gravidez está associada a alterações fisiológicas que mimetizam a doença hepática. Por exemplo, o estado hiperestrogénico pode resultar em *angioma de aranha* e *eritema palmar*, tipicamente associado à cirrose. Para além disso, alterações hemodinâmicas associadas à gravidez como aumento do volume plasmático e do débito cardíaco, resistência vascular esplâncnica e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona podem apresentar ou exacerbar manifestações de hipertensão portal. (53–55)

A morfologia do fígado não se altera na gravidez, mas o fluxo sanguíneo na artéria hepática e na veia porta aumentam significativamente. (50) No entanto, permanece impalpável durante a gravidez, pois é deslocado para cima pelo útero em expansão. (55) A ultrassonografia continua sendo a modalidade de imagem mais segura para visualizar o fígado durante a gravidez. No entanto, caso seja necessária uma imagem mais detalhada, a ressonância magnética sem contraste é segura. A ressonância magnética com gadolínio deve ser evitada devido à transferência transplacentária e efeitos desconhecidos no feto. (54,56) A motilidade da vesícula biliar é diminuída, o que aumenta a litogenicidade da biliar. (54)

Exames hepáticos alterados ocorrem em 3 a 5% das gestações e podem apresentar muitas causas diferentes, pelo que requerem avaliação e diagnóstico adequados de modo a perceber se a doença hepática está ou não relacionada com a gravidez. (54,57)

As doenças hepáticas numa mulher grávida, podem categorizar-se em três grupos (52,53):

- 1) Doenças hepáticas específicas da gravidez, como colestase intra-hepática da gravidez (ICP), síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, plaquetas baixas) e esteatose aguda da gravidez (AFLP);
- 2) Doença hepática e biliar ocorrendo durante a gravidez, como hepatite viral, colelitíase, etc;
- 3) Doença hepática crónica pré-existente, como hepatite crónica, cirrose, síndrome de Budd Chiari, etc.

B.2. Doenças hepáticas específicas da gravidez

Para garantir um atendimento oportuno e adequado que reduza os riscos para a gestante e para o seu feto/bebé, uma avaliação clínica expedita é fundamental para distinguir a doença hepática exclusiva da gravidez, da disfunção hepática não relacionada com a gravidez, sendo que o gastroenterologista/hepatologista tem um papel fundamental a desempenhar no diagnóstico, seguimento e tratamento de mulheres com doenças hepáticas associadas à gravidez. (53)

Para um diagnóstico preciso é necessária uma história clínica completa, incluindo gestações anteriores e a sua evolução, comportamentos de alto risco, terapêutica medicamentosa e exame físico cuidadoso com avaliação por ultrassom. A idade gestacional da gravidez é um importante indicador de diagnóstico e pode ajudar a adequar a investigação diagnóstica. Em particular, durante o primeiro trimestre, a principal causa de hipertransaminasémia é a hiperémese gravídica, que ocorre em 0,3% a 2% das gestações. Durante o segundo e terceiro trimestre, a hipertransaminasémia está relacionada com a pré-

eclâmpsia/eclâmpsia, a síndrome HELLP, a situação de esteatose aguda e, também, a ICP. (52)

As patologias hepáticas exclusivas da gravidez que serão abordadas nesta monografia são a ICP e a síndrome de HELLP. Embora esta última patologia não seja exclusiva da função hepática (outros sistemas estarão envolvidos refletindo as alterações associadas), normalmente está incluída nesta categoria.

B.2.1. Colestase intra-hepática da gravidez (ICP)

A ICP é uma das doenças hepáticas específicas mais comuns da gravidez.

Foi descrita pela primeira vez na literatura em 1883 como “icterícia recorrente na gravidez”. (58) Esta patologia requer um diagnóstico de exclusão e os diagnósticos diferenciais incluem pré-eclâmpsia, síndrome HELLP, AFLP e condições dermatológicas que induzem prurido. (52,57,59)

Epidemiologia: A incidência da ICP varia muito entre grupos étnicos e regiões geográficas. Ocorre mais frequentemente em grupos étnicos da América do Sul e do Norte da Europa (54,58), com maior incidência no Chile e Bolívia. (59) Na Europa, a incidência varia de 0,5% a 1,5%, com maior taxa na Escandinávia. (54,58) A incidência de colestase nos Estados Unidos varia de 0,32% em populações predominantemente brancas, a 5,6% em populações predominantemente latinas. (55,58) Em todo o mundo, a maior incidência é encontrada entre os índios Mapuche, um grupo de indígenas chilenos em que foi relatado que a colestase complica mais de 27% das gestações. (58) Sabe-se também que esta patologia apresenta padrões sazonais com maior incidência durante os meses de inverno. (58,60)

Fisiologia: Os ácidos biliares são sintetizados no fígado, no interior dos hepatócitos, por meio de múltiplas reações enzimáticas que culminam na criação dos dois ácidos biliares humanos primários: o ácido cólico e o ácido quenodesoxicólico. Este processo é altamente dependente da enzima 7 α -hidroxilase (CYP7A1), uma enzima do citocromo P450 que é exclusiva do fígado e que catalisa a etapa limitante da taxa de produção de ácidos biliares. O recetor farnesóide X (FXR), também conhecido como recetor de ácido biliar, é um recetor nuclear intracelular encontrado nos hepatócitos e em todo o intestino que, ao ligar-se aos ácidos biliares, é ativado resultando na supressão do CYP7A1. É através deste mecanismo que os ácidos biliares exercem inibição por *feedback* negativo na sua própria síntese. Para além deste recetor, o recetor pregnano X (PXR) e o recetor constitutivo de androstano (CAR) também desempenham um papel na homeostase dos ácidos biliares, regulando vias

alternativas. Uma vez formados, os ácidos biliares são exportados para o exterior dos hepatócitos através de proteínas específicas de transporte de ácidos biliares, que pertencem a uma superfamília de proteínas de transporte conhecidas como transportadores de cassete de ligação ao ATP (ABC). A maioria das bombas de transporte de ácidos biliares pertence à subfamília B (ABC-B), sendo as primárias a bomba de transporte ABCB-11, conhecida como bomba de exportação de sais biliares (BSEP), e a bomba de transporte ABCB-4, conhecida como proteína de transporte de resistência a múltiplas drogas 3 (MDR3). Estas bombas transportam sais biliares para os canalículos biliares imediatamente adjacentes, ductos biliares e, por fim, drenam para a vesícula biliar e intestino delgado. Estas bombas utilizam ATP para secretar ácidos biliares na bÍlis contra o gradiente de concentração e caracterizam a etapa limitante da taxa de transporte de ácidos biliares. (58)

A bÍlis é uma mistura complexa de lípidos, proteínas, sais minerais, vitaminas e vários outros elementos, sendo que os ácidos biliares correspondem a cerca de 67% da composição total da bÍlis, excluindo a água. (58)

Ao chegar ao trato gastrointestinal, os ácidos biliares mantêm sua função emulsificante e atuam como detergentes para quebrar e encapsular lípidos (colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina) e vitaminas lipossolúveis (por ex. vitamina K), formando as micelas mistas essenciais no transporte destes lípidos para o interior do enterócito. A solubilização destas moléculas lipofílicas é a função primária dos ácidos biliares. (58)

A maioria dos ácidos biliares é, então, recuperada ativamente por bombas de transporte no íleo. Eles movem-se através do sistema portal, geralmente ligados à albumina, e são ativamente transportados de volta para os hepatócitos através dos polipéptidos de co-transporte de taurocolato dependentes de sódio (NaTCP). Essas proteínas transportadoras têm alta especificidade e afinidade para os ácidos biliares, o que resulta numa taxa muito alta de recuperação de ácidos biliares (até 90%). Esta extração de primeira passagem extremamente eficiente confina os ácidos biliares à circulação entero-hepática e resulta em níveis baixos destes compostos no sangue periférico. (58)

Muitos dos ácidos biliares primários que atingem o trato gastrointestinal sofrem metabolismo bacteriano, o que leva à formação de mais de 50 ácidos biliares secundários diferentes. Modificações subseqüentes nos ácidos biliares secundários resultam na formação de ácidos biliares terciários, dos quais o ácido ursodeoxicólico (UDCA) é o mais conhecido. (58)

A colestase é definida por uma estagnação no fluxo biliar, seja devido à secreção diminuída ou à obstrução a jusante, que resulta na retenção de componentes biliares. Os ácidos biliares extra-hepáticos geralmente estão ligados aos fosfolípidos, mas quando não ligados, podem ser altamente citotóxicos. Na doença colestática, os sais biliares acumulam-

se nos hepatócitos, o que conseqüentemente leva a níveis anormais de ácidos biliares no sangue periférico. (58)

Etiologia: A etiologia é multifatorial e envolve fatores hormonais, genéticos e ambientais. (52,53,57,58)

A evidência clínica suporta um papel etiológico das hormonas sexuais na ICP devido a esta patologia ocorrer mais comumente no último trimestre da gravidez, quando as concentrações séricas são mais altas e, também, pelo facto de estar mais associada a gestações gemelares. (57–60) Esta condição é ainda apoiada por modelos *in vitro* que demonstraram que níveis elevados de estrogénio, em particular o 17 β -D-glucuronido, e metabolitos sulfatados de progesterona resultam na diminuição da função dos transportadores hepatocelulares BSEP e MDR3. (57–59,61) É evidente um aumento de casos nas mulheres tratadas com progesterona nos casos de risco de parto pré-termo. (50) O uso de contraceptivos orais de estrogénio entre mulheres com história pessoal ou familiar de ICP pode também resultar em características clínicas de ICP. (50,57)

A predisposição genética também desempenha um papel fundamental na patogénese da ICP e a incidência aumenta dentro da mesma família. (60) Estima-se que as mutações no transportador hepatocelular MDR3 sejam responsáveis por até 15% de todos os casos de ICP. (53,54,57) Mutações neste gene levam à perda de função e, portanto, ao aumento da concentração sérica de ácidos biliares. Apenas mutações heterozigóticas causam disfunção do transportador, enquanto a ausência completa da função de transporte está associada a doença hepática grave. (54) Também foram relatadas mutações noutros genes como ABCB11 (BSEP), FXR e TJP2. (53)

Algumas características da ICP, como a recorrência incompleta nas gestações subsequentes, a diminuição da prevalência e as variações sazonais, sugerem que fatores ambientais podem contribuir para a patogénese deste distúrbio. (59)

Para além disso, em algumas mulheres grávidas, a colestase pode ser precipitada pelo tratamento com drogas terapêuticas que podem causar lesão do ducto biliar ou colestase (por exemplo, amoxicilina ou flucloxacilina). (53) Por este mesmo motivo, deve ser evitado o uso destes antibióticos em mulheres que tiveram ICP no passado. (50)

Os principais fatores de risco para ICP são mulheres com gestação múltipla, fertilização *in vitro*, idade materna avançada, história familiar positiva, gravidez anterior afetada e infeção pelo vírus da hepatite C (HCV).(52,53,58)

Diagnóstico: O diagnóstico pode ser difícil, baseando-se em dados de anamnese, do exame objetivo e, essencialmente, nos parâmetros bioquímicos. (50)

- **Manifestações clínicas:** A ICP é classicamente diagnosticada quando uma mulher grávida no segundo ou, tipicamente, no terceiro trimestre relata prurido de início recente e, posteriormente, apresenta alterações nos testes de função hepática, incluindo o aumento de ácidos biliares séricos. O prurido, principal sintoma clínico, é normalmente generalizado, mas mais acentuado na palma das mãos e plantas dos pés. (50,53–55,57–61) Pode ser leve e tolerável para algumas grávidas, mas também muito grave e incapacitante, podendo prejudicar consideravelmente a qualidade de vida, ao causar privação do sono, sofrimento psicológico e até pensamentos suicidas. (53,57)

Estão descritos casos de esteatorreia, fezes claras e urina escura. (61) É importante identificar o subgrupo de mulheres com esteatorreia, pois a má absorção de vitamina K associada pode explicar a presença de coagulopatia num pequeno número de casos de ICP, assim como raros relatos de aumento do risco de hemorragia no momento do parto para as mães e de sangramento intracerebral para lactentes. (53) A dor abdominal, mal-estar e outros sintomas constitucionais são incomuns, embora possam aparecer em alguns casos. (57,61)

- **Achados laboratoriais:** A medição dos ácidos biliares séricos é atualmente considerada o marcador bioquímico mais eficaz para o diagnóstico e monitorização da ICP, (61) e que inclui os ácidos cólico, quenodesoxicólico, desoxicólico, ursodesoxicólico, litocólico e hiodesoxicólico. (58)

No soro de mulheres saudáveis não grávidas, os níveis de ácido quenodesoxicólico são superiores aos níveis de ácido cólico. No entanto, em mulheres com ICP, nota-se uma inversão, estando o ácido cólico muito aumentado em relação ao ácido quenodesoxicólico, frequentemente numa proporção de 3 para 1. Tradicionalmente, os ácidos biliares séricos eram doseados utilizando cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa, o que permitia identificar e dosear espécies individuais de ácidos biliares. Este método, no entanto, não é utilizado pela maioria dos hospitais e a necessidade de testes de envio pode ser acompanhada de potenciais atrasos nos resultados e, portanto, no diagnóstico. Um método alternativo são os ensaios enzimáticos de ácidos biliares que podem ser realizados de forma rápida e económica em muitos hospitais e laboratórios comerciais. Uma limitação desta técnica é a incapacidade de identificar tipos específicos de ácidos biliares. (58)

Alguns clínicos têm defendido a determinação da razão molar de ácido cólico/quenodesoxicólico de modo a aumentar a especificidade no diagnóstico de ICP. No entanto, os níveis séricos totais de ácidos biliares demonstraram ser igualmente sensíveis e específicos no diagnóstico de colestase. (58,61) A diretriz da Associação Europeia para o estudo do fígado (EASL) recomenda a medição de ácidos biliares

séricos em jejum, (53) sendo critério de diagnóstico uma concentração sérica superior a 10 $\mu\text{mol/L}$. (54,62) No entanto, a avaliação pós-prandial dos ácidos biliares pode ser um teste mais sensível, enquanto o jejum pode ser mais específico. (58) Os níveis séricos de ácidos biliares totais podem aumentar 10 a 100 vezes acima dos valores de referência. (57)

Supõe-se que o mecanismo por detrás do prurido colestático seja devido à ação pruritogénica direta de certos ácidos biliares na pele. (50,58) No entanto, esta hipótese é um pouco refutada pelo facto de que nem todos os pacientes com níveis elevados de ácidos biliares apresentam prurido e, naqueles que apresentam, os níveis de ácidos biliares não se correlacionam com a gravidade do prurido. Uma outra explicação para o prurido implicado na colestase relaciona-se com um substrato desconhecido da biliar que é libertado na corrente sanguínea após dano nos hepatócitos, secundário à acumulação de ácidos biliares. Há também evidências crescentes que implicam o recetor opióide *mu* numa via de prurido mediado pelo sistema nervoso central. Este fenómeno verifica-se após analgesia intratecal com opióides, por exemplo, no parto por cesariana. Para apoiar ainda mais esta hipótese, foi relatada uma redução do prurido colestático após a administração de antagonistas opióides. (58)

A acumulação de ácidos biliares nos hepatócitos causa hepatotoxicidade e há libertação de aminotransferases, bilirrubina, GGT e ALP no soro. (58) Assim, na ICP é comum verificar-se uma elevação das transaminases hepáticas e os níveis de bilirrubina podem aumentar em até 10% das gestações. (52,53) As concentrações séricas de GGT são modestamente elevadas, atingindo até quatro vezes os limites superiores normais (57) e os níveis séricos de ALP podem aumentar de 7 a 10 vezes o normal, mas são difíceis de interpretar devido à elevação da isoenzima da placenta. (57,58) Após lesão hepática aguda, a glutathione S transferase alfa (GSTa), uma enzima desintoxicante de fase II, é rapidamente libertada na corrente sanguínea, sendo considerada um indicador mais preciso de disfunção hepática do que os testes de função hepática convencionais. (61)

Embora a biópsia hepática seja raramente necessária para o diagnóstico, os achados histopatológicos na colestase incluem a presença anormal de biliar nas estruturas hepáticas (citoplasma, canalículos ou ductos) ou alterações secundárias não inflamatórias atribuídas ao efeito detergente dos ácidos biliares retidos (inchaço hidrópico pseudoxantomatoso dos hepatócitos, amarelecimento ou clarificação citoplasmática, trombos biliares, ductos biliares dilatados/hiperplásicos, necrose de refeição biliar, entre outras). (50,58)

Complicações: Esta condição raramente apresenta complicações significativas para a mãe pois, geralmente, o prurido desaparece nos primeiros dias após o parto, assim como a normalização das concentrações dos ácidos biliares séricos e outros testes hepáticos. (59) No entanto, pode estar associada a um aumento na incidência de pré-eclâmpsia e esteatose aguda da gravidez. Para além disso, a longo prazo foi relatado uma maior incidência de doença hepatobiliar (por exemplo, hepatite C, cirrose, cálculos biliares, colecistite) (55,57,59,61), malignidade hepática primária e das árvores biliares (55,61), problemas cardiovasculares e doenças autoimunes. (61)

Relativamente aos efeitos sobre o feto, a colestase intra-hepática pode levar a complicações como hipóxia, prematuridade, presença de mecónio no líquido amniótico, morte perinatal, sofrimento fetal e natimorto, particularmente quando associado a níveis séricos de ácidos biliares $> 40 \mu\text{mol/L}$ (53–55,57–59,61) e hiperbilirrubinémia. (61) Isto é explicado pelo aumento da transferência de ácidos biliares da mãe para o feto, que mostraram capacidade reduzida de eliminar ácidos biliares através da placenta, levando ao aumento destes no cordão umbilical e líquido amniótico. (60)

Há evidências de que concentrações elevadas de ácidos biliares causam arritmias cardíacas e induzem a contração das veias coriônicas da placenta, estando assim implicados no trabalho de parto prematuro espontâneo e de morte fetal súbita. (53,57,58,60,61) Para além disso, experiências recentes realizadas em amostras de miométrio humano demonstraram que os ácidos biliares aumentam a expressão e a sensibilidade do recetor de oxitocina, podendo também explicar o risco aumentado de parto prematuro espontâneo em pacientes com ICP. Curiosamente, apenas o ácido cólico provocou esta resposta. (58,59,61)

Bebés nascidos de mães com ICP na mesma idade gestacional têm quase três vezes mais probabilidade de ter problemas respiratórios no parto. De acordo com pesquisas recentes, níveis elevados de ácidos biliares podem interferir na síntese normal de uma substância chamada surfactante, que auxilia no desenvolvimento do sistema respiratório do bebé após o nascimento. O parto deve ser agendado num local que possa atender esses bebés, pois há maior probabilidade de ser internado numa unidade de cuidados intensivos neonatais (UCIN) após o nascimento. (61)

Tem-se verificado uma diminuição acentuada nas complicações fetais possivelmente devido a uma maior conscientização sobre a doença, acompanhamento mais próximo e experiência em centros especializados. (57,59)

Tratamento: O ácido ursodesoxicólico (UDCA) é o tratamento mais usado para tratar ICP. É utilizado na dosagem de 10-15 mg/kg/dia, sendo eficaz na redução do prurido, na melhoria dos testes hepáticos e dos níveis séricos endógenos de ácidos biliares em mulheres com ICP. (50,52,54,56–60) Para além disso, diminui as concentrações de metabolitos

sulfatados de progesterona. Estudos também mostraram que aumenta a expressão da bomba de exportação de sais biliares (MDR3 e BSEP). (54) Um outro efeito do tratamento materno com UDCA no curso da ICP é a melhoria do prognóstico fetal através da redução dos ácidos biliares no compartimento fetal, enquanto restaura a capacidade de a placenta realizar a transferência desses compostos para a mãe. (60)

A colestiramina, resina de troca iônica forte, reduz a absorção dos ácidos biliares no íleo aumentando a sua excreção fecal. No entanto, não é considerado um tratamento de primeira linha pois pode contribuir para o aparecimento de esteatorreia e aumentar o déficit de vitamina K. (50,58,59) A plasmaférese foi experimentada e pode diminuir a gravidade do prurido, além de melhorar parcialmente os distúrbios bioquímicos, mas é um procedimento de alto risco, devendo, por esta razão, ser reservado para casos graves em que todas as outras opções de tratamento forem esgotadas. Outra opção para esses casos é a drenagem nasobiliar. No entanto, continua a haver necessidade de melhores medicamentos/procedimentos para tratar a ICP. (53)

Mentol, loções e anti-histamínicos (orais e tópicos) demonstraram ser seguros e eficazes no alívio do prurido. No entanto, essas substâncias não atuam a nível da função hepática ou dos níveis de ácidos biliares. (55,58)

Como as concentrações séricas elevadas de ácidos biliares estão associadas ao risco de natimorto e os ácidos biliares séricos podem continuar a aumentar com o avanço da gestação, é aconselhável continuar a monitorizar, devendo ser efetuados testes semanais de função hepática ao longo da gravidez. (53,58)

Em geral, o parto resolve os sintomas maternos acompanhados pela normalização dos testes hepáticos séricos. (52,54,57) Assim, o parto precoce tornou-se amplamente implementado no tratamento da ICP devido ao aumento das taxas de morte fetal com o avanço da idade gestacional, particularmente após a 36ª semana. O parto antes de 36 semanas pode ser indicado dependendo das circunstâncias laboratoriais e clínicas. (53,55,58,62) Quando o parto está a ser considerado, a vitamina K deve ser administrada em casos de prolongamento do tempo de protrombina secundário à colestase, para reduzir a hemorragia periparto. (55)

A dexametasona pode ser usada, se necessário, para promover a maturidade pulmonar fetal antes do parto de um feto prematuro. (54,56) Para além disso, deve ser administrada vitamina K ao recém-nascido imediatamente a seguir ao parto para reduzir o risco de hemorragia intracraniana, sobretudo se a mãe tiver sido medicada com colestiramina.(50)

Como a ICP pode ser um preditor para o desenvolvimento de doença hepática e biliar materna no futuro (54), é importante confirmar que os sintomas, testes bioquímicos de função

hepática e as concentrações séricas de ácidos biliares voltam ao normal dentro de 3 meses após o parto. (53)

Recorrência: A ICP recorre durante as gestações subsequentes em 45-70% com gravidade variável (53,57,59), com tendência a ser mais grave e a ocorrer em idade gestacional mais precoce. (58) A ocorrência em 60-90% das gestações subsequentes sugere uma alteração genética com expressão provocada pelas hormonas da gravidez ou pelo uso de anticoncetivos orais. (50)

Para mulheres com ICP anterior de início precoce, com concentrações séricas de ácidos biliares acima ou iguais a 40 mmol/L, há 20% de hipóteses de ter uma mutação patogénica no gene ABCB11/ABCB4. Assim, nestes casos, é aconselhável considerar triagem genética, assim como àquelas com histórico familiar de doença hepatobiliar. (53)

B.2.2. Síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas aumentadas, plaquetas baixas)

Os distúrbios hipertensivos da gravidez são uma das principais causas de mortalidade materna e perinatal em todo o mundo, com pré-eclâmpsia/eclâmpsia complicando 2% a 8% das gestações e responsável por 25% das complicações maternas graves, incluindo a morte. (53) Define-se hipertensão arterial (HTA) na gravidez como tensão arterial sistólica superior ou igual a 140 mmHg ou diastólica superior ou igual a 90 mmHg, em duas medições separadas por, pelo menos, 4 horas. (62)

A pré-eclâmpsia geralmente envolve mulheres normotensas previamente saudáveis, após 20 semanas de gestação, geralmente no terceiro trimestre, sem fatores de risco conhecidos ou partos anteriores. (63) Esta condição é caracterizada, normalmente, por níveis de pressão arterial elevados associados à presença de proteínas na urina. (48,52,55,63,64) O controlo rigoroso da pressão arterial é essencial, mas o envolvimento hepático está relacionado a uma pré-eclâmpsia mais grave, devendo ser realizado o parto. (52) Se a mãe desenvolver convulsões generalizadas, a condição é chamada de eclâmpsia. (48,55)

A síndrome HELLP foi descrita pela primeira vez em 1982 por Weinstein. (54,65,66) Ocorre em 0,5 a 0,9% de todas as gestações (65–67) e em até 20% das mulheres com pré-eclâmpsia. (52,53) Pode também ocorrer em grávidas normotensas e sem proteinúria. (50,52–54,66) Ou seja, pode representar uma complicação ou progressão da pré-eclâmpsia grave, no entanto, essa relação foi contestada por evidências recentes de que podem ser distúrbios separados, já que hipertensão ou proteinúria estão ausentes em, pelo menos, 15 a 20% das pacientes com síndrome HELLP. (64) Esta patologia é caracterizada por anemia hemolítica, enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas. (52–54) Avaliando a progressão natural da síndrome, Weinstein concluiu que a trombocitopenia ocorre primeiro,

desenvolvendo-se, posteriormente o aumento das enzimas hepáticas e finalmente a hemólise. (65)

Existem doenças graves que podem mimetizar a síndrome HELLP, como AFLP, a síndrome hemolítico-urémica (SHU), a púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) e o LES. Estas patologias podem apresentar elevada morbidade e mortalidade, pelo que um diagnóstico diferencial é necessário para que seja realizada uma gestão adequada. (66,68)

Etiologia: Até hoje, não foi possível identificar-se, a nível mundial, uma causa genética para um risco aumentado de síndrome HELLP. Um provável mecanismo etiológico é representado pelo efeito combinado de múltiplas variantes genéticas com efeitos adicionais de fatores maternos e ambientais. (63,67)

Alguns estudos afirmam que variantes genéticas no gene Fas e VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) e mutação do fator de coagulação V Leiden (FVL) estão associadas a um risco aumentado de HELLP em comparação com mulheres saudáveis. Para além disso, variantes no gene do recetor de glicocorticóide e no gene do recetor do tipo Toll (TRL) aumentam o risco de síndrome HELLP. (67) Embora a razão precisa ainda não tenha sido totalmente elucidada, níveis inadequados de citocinas que levam a uma série de modificações fisiopatológicas parecem ser a base desta síndrome. (67)

Foi recentemente relatado que pacientes com infeção por SARS-CoV-2 durante a gravidez apresentam risco aumentado de pré-eclâmpsia e síndrome HELLP. (64)

Os fatores de risco são idade materna avançada, multiparidade e etnia caucasiana. (50,52,54)

Fisiopatologia: As principais características fisiopatológicas da pré-eclâmpsia são invasões trofoblásticas superficiais que afetam a remodelação de artérias espiraladas, o que leva à diminuição do fluxo sanguíneo da placenta uterina, aumento do *stress* oxidativo placentário e ainda um desequilíbrio entre fatores angiogénicos e anti-angiogénicos. Estas alterações preparam o terreno para o desenvolvimento de HELLP pois induzem disfunção endotelial e uma resposta inflamatória sistémica. (50,53,55,63,64)

Partículas sinciciotrofoblásticas e outros fatores placentários interagem com as células imunológicas maternas e as células endoteliais vasculares, ativando a cascata de coagulação e o complemento. A regulação prejudicada do complemento pode levar ao desenvolvimento de microangiopatia trombótica observada em grávidas com síndrome HELLP. (67) O nível sérico do fator von Willebrand multimérico ativo (VWF) é maior neste distúrbio em comparação com a gravidez normal. É libertado por células endoteliais vasculares fortemente ativadas e promove a agregação plaquetária favorecendo a adesão das plaquetas à íntima dos vasos e, por conseguinte, à trombocitopénia.(63,67) Esta deposição e agregação das

plaquetas nas áreas de endotélio alterado agravam, ainda mais, as lesões da íntima (50,67), diminuindo a produção de prostaciclina. Estas alterações contribuem para o desencadear de vasoconstrição generalizada, mais agravada ainda pelo aumento da produção de endotelina com potente atividade vasoconstritora.(50)

Por outro lado, os eritrócitos vão sofrendo danos à medida que passam através dos vasos sanguíneos com comprometimento do endotélio e da deposição de fibrina nas paredes vasculares, resultando em anemia hemolítica microangiopática (MAHA). (53,65,67)

A nível do tecido hepático, a lesão isquémica resultante desencadeia a libertação de mediadores pró-inflamatórios, resposta ao *stress* oxidativo dos hepatócitos e aumento da lesão das células hepáticas. (53,55,67) As enzimas hepáticas elevadas refletem lesão na microcirculação hepática e consequente comprometimento de sua função. (65)

Apresenta-se, na figura 15, o esquema da fisiopatologia da síndrome HELLP.

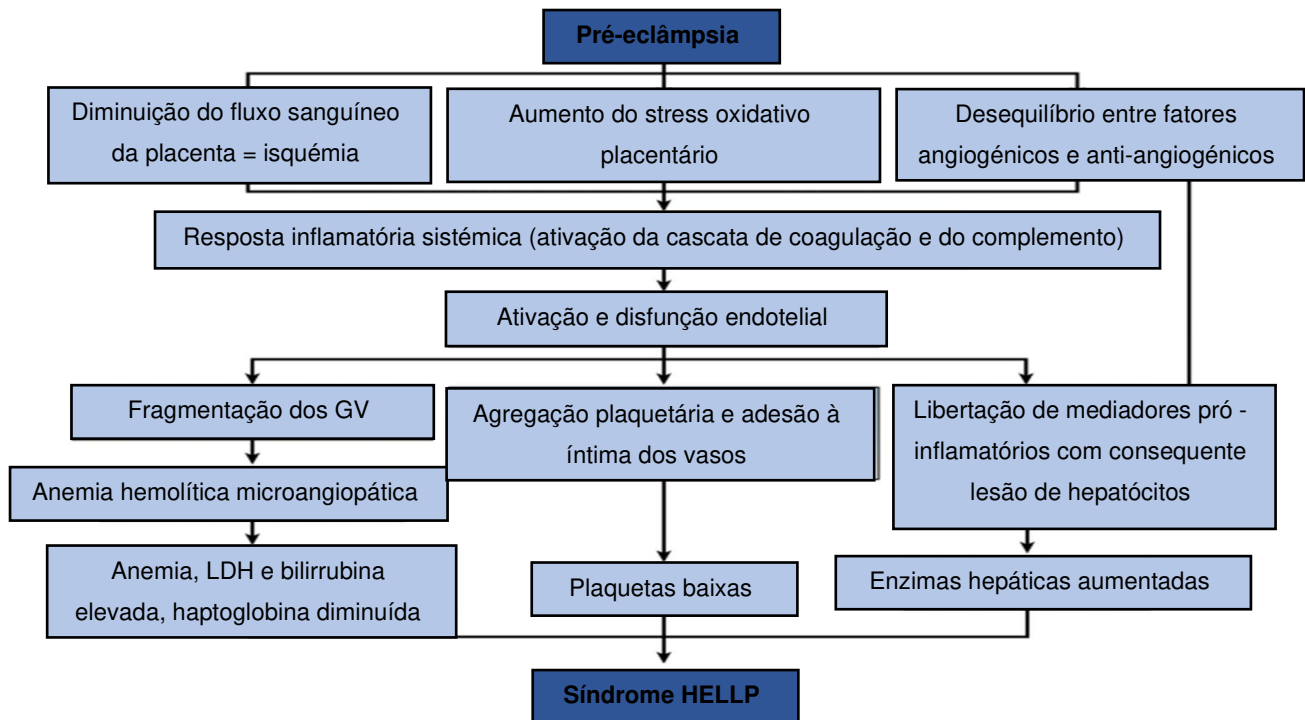


Figura 15 - Esquema da fisiopatologia da síndrome HELLP

Alterações na placenta associadas a pré-eclâmpsia predispõem o desenvolvimento da síndrome HELLP. Lesão isquémica com libertação aumentada de mediadores inflamatórios na circulação materna e desequilíbrio entre fatores pró e antiangiogénicos levam à ativação das vias de coagulação e do complemento. A cascata de coagulação é ativada pela adesão das plaquetas ao endotélio ativado e danificado. Os glóbulos vermelhos são lisados à medida que fluem através dos vasos danificados, causando anemia hemolítica microangiopática. Lesão microvascular de múltiplos órgãos e necrose hepática levam às manifestações clínicas da síndrome HELLP (Adaptado de (53))

Diagnóstico: A síndrome HELLP pode ser diagnosticada antes do parto (em 70% dos casos, entre a 27^a e a 30^a semana de gestação) ou após o parto (desde algumas horas, até ao 6^o dia, com a média a ocorrer às 48 horas). (50,52–54,64,65) O diagnóstico é baseado principalmente na apresentação clínica e na avaliação laboratorial.

- **Manifestações clínicas:** As grávidas com esta síndrome, geralmente apresentam dor epigástrica e no quadrante superior direito (sobre o fígado), náuseas acompanhadas, ou não, por vômitos, ganho de peso ou edema, cefaleia e mal-estar. (52–56,64) Por outro lado, um número significativo de grávidas é assintomático. Ao exame, hipertensão e proteinúria estão presentes em até 85% dos casos. (52,54,55) A icterícia é rara, ocorrendo em apenas 5% dos casos. (56) No entanto, as mulheres com síndrome HELLP podem, também, apresentar sintomas inespecíficos ou sinais subtis de pré-eclâmpsia. Os sintomas geralmente progridem continuamente e a sua intensidade, geralmente, muda espontaneamente. A síndrome HELLP é caracterizada por exacerbação durante a noite e recuperação durante o dia. (66)
- **Achados laboratoriais:** A hemólise resulta da anemia hemolítica microangiopática, podendo ser identificada macroscopicamente pela presença de hemoglobinémia ou hemoglobinúria em cerca de 10% das mulheres grávidas com síndrome HELLP. A hemoglobina libertada, devido à hemólise, é convertida em bilirrubina não conjugada no baço ou liga-se à haptoglobina. O complexo hemoglobina-haptoglobina é rapidamente sequestrado pelo fígado, o que leva a uma diminuição pronunciada dos níveis plasmáticos de haptoglobina, chegando por vezes a níveis indetetáveis, uma vez que esta proteína não é produzida em resposta ao seu consumo. (65,66) Alterações bioquímicas notáveis incluem hemólise - altos níveis séricos de bilirrubina total superior ou igual a 1,2 mg/dl ou lactato desidrogenase (LDH) superiores a 600 UI/l ou haptoglobina inferior ou igual a 25 mg/dl - elevação das transaminases (AST superior a 70 UI/L ou duplicação do valor habitual) e contagem de plaquetas inferior a 100000/mm³. (62) A contagem de glóbulos brancos é maior nestas doentes e está correlacionada com a gravidade da síndrome. (67)

Um outro indicador da anemia hemolítica microangiopática é a presença de glóbulos vermelhos fragmentados (esquizócitos) ou contraídos com espículas (equinócitos) no esfregaço de sangue periférico. (63,65–67) Glóbulos vermelhos policromáticos também são observados e o aumento da contagem de reticulócitos reflete a libertação compensatória de glóbulos vermelhos imaturos no sangue periférico. (66) O tempo de protrombina permanece normal, a menos que haja evidência de coagulação intravascular disseminada (CID) ou lesão hepática grave. (53,54,64) Teores de ácido úrico sérico superior a 464 µmol/L (7,8 mg/dL) está associado a aumento da mortalidade materna e fetal. (54)

A ultrassonografia abdominal é indicada para avaliar o tamanho do fígado, patência da vascularização e sinais de hipertensão portal. Ascite detetada por imagem e/ou clinicamente, pode estar presente e frequentemente é transitória com características de

líquido ascítico consistentes com hipertensão portal. (53) Este exame continua a ser uma ferramenta rápida e segura para descartar hematomas subcapsulares e rotura hepática. (55) A biópsia hepática continua sendo um procedimento de alto risco devido à trombocitopénia.(54)

Na figura 16 estão representados os sistemas de classificação reconhecidos da síndrome HELLP: Tennessee e Mississippi. (54,65–67)

HELLP class	Tennessee Classification	Mississippi classification
1	Platelets $\leq 100 \cdot 10^9/L$ AST ≥ 70 IU/L LDH ≥ 600 IU/L	Platelets $\leq 50 \cdot 10^9/L$ AST or ALT ≥ 70 IU/L LDH ≥ 600 IU/L
2		Platelets $\leq 100 \cdot 10^9/L$ $\geq 50 \cdot 10^9/L$ AST or ALT ≥ 70 IU/L LDH ≥ 600 IU/L
3		Platelets $\leq 150 \cdot 10^9/L$ $\geq 100 \cdot 10^9/L$ AST or ALT ≥ 40 IU/L LDH ≥ 600 IU/L

Figura 16 - Sistemas de classificação da síndrome HELLP: Tennessee e Mississippi (66)

A classificação de Tennessee é amplamente utilizada para diagnóstico. (67,68) Neste tipo de classificação, o resultado pode ser completo (demonstração de hemólise, aminotransferases elevadas e trombocitopénia) ou incompleto, isto é, englobando apenas um ou dois componentes da tríade. (50,53,54,65,67,68) A classificação de Mississippi sublinha a gravidade do distúrbio de acordo com a intensidade da trombocitopénia. (50,67,68) Estas classes têm sido usadas para o estabelecimento de medidas mais agressivas (plasmaférese, por exemplo), bem como para prognosticar a rapidez da recuperação pós-parto e o desfecho materno e perinatal. (50)

Complicações: As complicações maternas e fetais da síndrome HELLP são relevantes. A taxa de mortalidade materna é de 1% e a perinatal é de 6 a 70%. (52,54) No entanto, foram relatadas taxas de mortalidade materna mais elevadas em casos de hemorragia cerebral ou rotura hepática. (66)

As complicações maternas incluem edema pulmonar e CID, com evidência de produtos de degradação de fibrina elevados e dímeros d, fibrinogénio baixo e aumento secundário do tempo de protrombina. (50,52). A mortalidade materna também está relacionada com casos em que ocorre descolamento prematuro da placenta, hemorragia pós-parto ou insuficiência renal aguda. (64) As complicações neurológicas potencialmente fatais

da síndrome HELLP são raras, mas incluem hemorragias cerebrais extensas ou a nível do tronco cerebral, trombose e infartos ou edema cerebral complicado por hérnia cerebral. (66)

A obstrução sinusoidal hepática e intra-congestão vascular contribuem para aumento da pressão hepática e necrose, levando a hemorragia subcapsular e intraparenquimatosa. A neovascularização, desencadeada pela lesão isquémica, pode contribuir ainda mais para o risco de hemorragia, dada a fragilidade dos novos vasos no contexto dos episódios hipertensivos. A hemorragia intra-hepática, se extensa, leva a um hematoma subcapsular, com risco de rotura com expansão, aumento abrupto da pressão arterial ou trauma. (50,53,55,64,65,67) Deve suspeitar-se de infarto hepático quando existe dor no quadrante superior direito com febre, enquanto inchaço abdominal ou apresentação de choque podem ocorrer em caso de rotura hepática. (56)

O mau prognóstico perinatal é devido ao descolamento prematuro da placenta, hipóxia intrauterina, asfixia, prematuridade e baixo peso ao nascer. (64,66) A trombocitopenia neonatal ocorre entre 15% e 38% dos casos e é um fator de risco significativo para hemorragia intraventricular e complicações neurológicas de longo prazo. Também foram relatadas complicações típicas após o parto prematuro, como a síndrome do *stress* respiratório e persistência do canal arterial. (66)

Tratamento: Todas as grávidas com diagnóstico de síndrome HELLP devem ser transferidas para um hospital dotado de todos os recursos obstétricos e com unidades de cuidados intensivos, tanto para recém-nascidos como para adultos. (50)

O apoio da anestesiologia e imunohemoterapia são importantes para considerar suporte transfusional (plaquetas, plasma fresco congelado, concentrado eritrocitário) em caso de coagulopatia ou trombocitopenia inferior a 40000/ mm³ e a plasmáfereze em situações refratárias. (62) A transfusão de plaquetas deve ser considerada antes do parto, especialmente se houver probabilidade de cesariana. (56)

Uma vez que a síndrome HELLP se desenvolve, o único tratamento eficaz é o parto imediato, especialmente após 34 semanas de gestação. Deve administrar-se sulfato de magnésio para prevenir convulsões maternas, sempre que os valores tensionais estiverem aumentados e corticosteroides para, não só promover a maturidade pulmonar fetal, quando a gestação é inferior a 34 semanas, como aumentar da contagem das plaquetas. (50,52,55,64–66) Em caso de agravamento da pressão arterial e/ou dos parâmetros laboratoriais, ocorrência de disfunção hepática grave, CID ou deslocamento prematuro da placenta a interrupção imediata da gestação é necessária, seja qual for o tempo de gravidez. (50) A cesariana é a opção mais segura nas complicações hepáticas, CID, complicações neurológicas graves e no edema pulmonar grave ou quando não há resposta rápida à

terapêutica. (62) Uma intervenção cirúrgica, incluindo transplante de fígado, pode ser necessária se houver evidência de rotura do fígado. (64)

Após o parto, uma monitorização rigorosa da mãe deve continuar, pois algumas mulheres podem piorar a trombocitopenia e aumentar os níveis de LDH até 2 dias após o parto, o que poderá desencadear um processo hemorrágico. Habitualmente, a síndrome HELLP está completamente regredida uma semana após o parto, mas na classe I do sistema de Mississippi, a normalização dos parâmetros requer um período mais longo, assim como em situações em que ocorreu deslocamento prematuro da placenta, CID ou disfunção renal importante. (50,52,68)

Recorrência: As mulheres com síndrome HELLP, principalmente as portadoras de hipertensão arterial crónica, apresentam uma taxa elevada de complicações em futuras gestações (pré-eclâmpsia, parto pré-termo, entre outras), mas a probabilidade de ocorrer uma nova síndrome HELLP é relativamente baixa. (50) O risco de recorrência relatado mais elevado foi de 7%. (55)

Conclusão

O estágio curricular realizado no Laboratório Fernanda Galo, em Tomar, foi muito positivo no que se refere à aquisição de competências, tendo sido possível aprofundar e por em prática muitos dos conhecimentos adquiridos no Mestrado em Análises Clínicas. Ao longo de seis meses, foi possível ver e contactar diretamente com um elevado número de equipamentos utilizados na realização de um leque muito alargado de parâmetros nas diversas áreas, perceber os princípios do seu funcionamento, verificar como é feito o processamento das amostras e o controlo de qualidade dos resultados obtidos, bem como perceber eventuais interferências sobre cada um dos parâmetros, de forma a prevenir a sua ocorrência e, assim, contribuir para que sejam entregues aos utentes resultados precisos e fiáveis.

Relativamente à temática desenvolvida na monografia e que relacionava a bioquímica clínica na gravidez, em particular na avaliação da função hepática e patologias que lhe podem estar associadas, foram referidas as alterações fisiológicas que ocorrem ao nível das diferentes funções incluindo, necessariamente, na função hepática. No entanto, é importante salientar a necessidade de saber distinguir o limiar entre o fisiológico e o patológico para que, quando necessário, seja realizado um diagnóstico rápido e preciso, tendo presente que é fundamental perceber quando a doença hepática está, ou não, relacionada com a gravidez, já que se diferenciam os modos de atuação a adotar. Para o efeito, a investigação deve incluir a história clínica, o exame físico e os exames laboratoriais e imagiológicos.

Uma vez que, por um lado, a doença hepática na gravidez se pode apresentar desde alterações subtis no perfil bioquímico do fígado a uma insuficiência hepática fulminante e, por outro lado, como as duas patologias descritas - colestase intra-hepática e síndrome HELLP - são bastante complexas, é fundamental a existência de uma equipa multidisciplinar para que os efeitos e eventuais complicações sejam reduzidas ao mínimo possível, tanto para a mãe como para o seu bebé.

Bibliografia

1. Nunes A, Faustino C. Manual de Colheitas. 2012.
2. Beckman Coulter DxC 700 AU. Reference Manual [Internet]. 2021. Available from: www.beckmancoulter.com
3. Beckman Coulter. Instruções de uso da série UniCel DXH com software gerenciador do sistema [Internet]. 2020. Available from: www.beckmancoulter.com
4. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis Practical Haematology. 9th edition. Churchill Livingstone, editor. 2001.
5. Bain B. Blood Cells, A Practical Guide. 2th edition. Blackwell Publishing, editor. 1995.
6. International Society For Laboratory Hematology. Suggested Criteria for Action Following Automated CBC and WBC Differential Analysis. In 2005. Available from: https://www.islh.org/web/consensus_rules.php
7. Koepke JA, Bull BS, Simson E, Assendelft OW van. H2-A4 - Reference and Selected Procedure for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Test; Approved Standard. 14th edition. Vol. 20. National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000.
8. Diesse Diagnostica Senese S.p.A. Manual de Instrucciones Ves-matic 30/30Plus. 2001.
9. Jacques Wallach MD. Interpretação de Exames Laboratoriais. 8ª Edição. Guanabara Koogan S.A.; 2009.
10. Norma da Direção-Geral da Saúde nº033. Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c [Internet]. 2011. Available from: www.dgs.pt
11. Arkray Global Business I. Analisador automático de Glicohemoglobina ADAMS A1c HA-8180T [Internet]. [cited 2023 Oct 20]. Available from: <https://www.arkray.eu/pt/portuguese/products/diabetes/habalc/ha-8180t.html>
12. Jacobs DS, DeMott WR, Oxley DK. Laboratory Test Handbook. 5th Edition. Lexi-comp Inc, editor. 2001.
13. Diagnostica Stago. Manual de referência STA Compact Max. 2012.
14. STA - NeoPTímal Determinação do tempo de protrombina (TP). Diagnostica Stago S.A.S. 2019.
15. STA - C.K. PREST Determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). Diagnostica Stago S.A.S. 2018.
16. STA - Liquid FIB Determinação quantitativa do fibrinogénio segundo Clauss. Diagnostica Stago S.A.S. 2019.
17. Serigrup Diana A1B. Diagnostic Grifols, S.A. 2015.
18. DG Gel ABO/Rh. Diagnostic Grifols, S.A. 2017.
19. DG Gel Coombs. Diagnostic Grifols, S.A. 2018.
20. Diagnostics Worldwide LIA Line Immunoassays [Internet]. 2020 [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://www.human.de/technologies>
21. Human Diagnostics Worldwide. IMTEC-ANA-LIA XL Expanded panel – enhanced efficiency [Internet]. BioMed Central Ltd; 2020 [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://www.human.de/rheumatology>

22. Human Diagnostics Worldwide. Gastroenterology - Autoantibodies indicating gastrointestinal diseases [Internet]. 2023 [cited 2023 Sep 25]. Available from: <https://www.human.de/gastroenterology>
23. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. IIFT Mosaico: HEp-2/Fígado (macaco) - Instruções para o teste de imunofluorescência indireta. Germany; 2021.
24. Architect CA 15-3. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
25. Architect CA 125 II. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
26. Architect HAVAb-IgM. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2004.
27. Architect HAVAb-IgG. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2004.
28. Architect HBsAg Qualitative II. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
29. Architect Anti-HBs. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
30. Architect Anti-HBc II. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2008.
31. Architect HBeAg. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2008.
32. Architect Anti-HBe. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2004.
33. Architect Anti-HCV. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
34. Architect HIV Ag/Ab Combo. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
35. Architect Rubella IgM. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2007.
36. Architect Rubella IgG. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
37. Architect Toxo IgM. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2008.
38. Architect Toxo IgG. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2009.
39. Architect CMV IgM. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2007.
40. Architect CMV IgG. Abbott Laboratories Diagnostics Division. 2008.
41. Access CEA Carcinoembryonic Antigen. Beckman Coulter, Inc. 2020.
42. Access Immunoassay Systems - Hybritech PSA. Beckman Coulter, Inc. 2010.
43. Access Imunoassay Systems - Hybritech free PSA. Beckman Coulter, Inc. 2011.
44. IRMA CA 19-9 antigen. Beckman Coulter, Inc. 2023.
45. Anticorpos Antitireoglobulina Access II - Instruções de Uso. Beckman Coulter. 2020.
46. Access TPO Anticorpo antitireoperoxidase - Instruções de Uso. Beckman Coulter. 2020.
47. Faustino C. Plano de gestão de controlo da qualidade - Requisitos e ferramentas. In: Fernanda Galo Laboratórios, editor. 2017.
48. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. In: Sixth edition. 2018. p. 1655–95.
49. Norma da Direção Geral de Saúde nº037. Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco [Internet]. 2011. Available from: www.dgs.pt
50. Luís Mendes da Graça e Colaboradores. Medicina Materno-Fetal. 5ª Edição. Lidel - Edições Técnicas Lda, editor. 2017.
51. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res.* 2004;114(5-6 SPEC. ISS.):397–407.
52. Guarino M, Cossiga V, Morisco F. The interpretation of liver function tests in pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2020 Feb 1;44–45.

53. Terrault NA, Williamson C. Pregnancy-Associated Liver Diseases. *Gastroenterology*. 2022 Jul 1;163(1):97-117.e1.
54. Joshi D, James A, Quaglia A, Westbrook RH, Heneghan MA. Liver disease in pregnancy. *The Lancet*. 2010;375(9714):594–605.
55. Katarey D, Westbrook RH. Pregnancy-specific liver diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2020 Oct 1;68:12–22.
56. Tran TT, Ahn J, Reau NS. ACG clinical guideline: Liver disease and pregnancy. *American Journal of Gastroenterology*. 2016 Feb 1;111(2):176–94.
57. Pusl T, Beuers U. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2(1).
58. Smith DD, Rood KM. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2020 Mar 1;63(1):134–51.
59. Kondrackiene J, Kupcinskis L. Intrahepatic cholestasis of pregnancy-current achievements and unsolved problems. *World J Gastroenterol*. 2008 Oct 14;14(38):5781–8.
60. Brites D. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Changes in maternal-fetal bile acid balance and improvement by ursodeoxycholic acid. 2002;
61. Sahni A, Jogdand SD. Effects of Intrahepatic Cholestasis on the Foetus During Pregnancy. *Cureus*. 2022 Oct 25;
62. Ayres De Campos D, Pinto L. *Protocolos de Obstetrícia e Medicina Materno-Fetal*. Lidel. 2022.
63. Gardikioti A, Venou TM, Gavriilaki E, Vetsiou E, Mavrikou I, Dinas K, et al. Molecular Advances in Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 1;23(7).
64. Khalid F, Mahendraker N, Tonismae T. HELLP Syndrome. 2023 Jul 29; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560615/>
65. Dusse LM, Alpoim PN, Silva JT, Rios DRA, Brandão AH, Cabral ACV. Revisiting HELLP syndrome. *Clinica Chimica Acta*. 2015 Dec 7;451:117–20.
66. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: Clinical issues and management. A review. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2009 Feb 26;9.
67. Petca A, Miron BC, Pacu I, Dumitrașcu MC, Mehedințu C, Șandru F, et al. HELLP Syndrome—Holistic Insight into Pathophysiology. *Medicina (Lithuania)*. 2022 Feb 1;58(2).
68. Arigita Lastra M, Martínez Fernández GS. HELLP syndrome: controversies and prognosis. *Hipertens Riesgo Vasc*. 2020 Oct 1;37(4):147–51.