

bioanálise

Ano XI • N.º 1 • 2015



The poster features a blue and yellow wavy background with a grid pattern. It includes the SPBS logo, the title 'XII CONGRESSO ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA', the location 'PORTO', the venue 'Auditério Universidade Fernando Pessoa', the date '18 ABRIL 2015', and contact information for the Sociedade Portuguesa de Bioanalistas Clínicos. At the bottom, there are logos for various sponsors including Siemens, Enzifarma, and others.

SPBS **XII CONGRESSO**
ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

PORTO
Auditério Universidade
Fernando Pessoa
18 ABRIL
2015

SOCIEDADE PORTUGUESA
DE BIOANALISTAS CLÍNICOS
Ap. 2009 • 3501-909 Viseu • www.spbs.pt • spbsgeral@gmail.com • Tlm. 966931470
www.facebook.com/sociedadeportuguesa.bioanalistasclinicos

SIEMENS **enzifarma** **Ultravide** **Cogefarm** **DOUGES**
beira alta **ALBA** **oportunidade** **porto maris** **EURO**

XII CONGRESSO
DE ANÁLISES
CLÍNICAS E
SAÚDE PÚBLICA
DA SOCIEDADE
PORTUGUESA DE
BIOANALISTAS
CLÍNICOS

12th CONGRESS OF
CLINICAL ANALYSES
AND PUBLIC HEALTH
OF THE PORTUGUESE
SOCIETY OF CLINICAL
BIOANALYSTS



SOCIEDADE PORTUGUESA DE BIOANALISTAS CLÍNICOS

Normas de publicação

A **Revista BioAnálise (RB)**, aceita para publicação artigos que apresentem resultados de Investigação Básica e Aplicada na Área das Análises Clínicas e Saúde Pública (Ramo Laboratorial). Todos os artigos serão sujeitos a um processo de revisão antes da decisão de publicação, cabendo ao Director Científico a decisão final, com base nos pareceres do Conselho Científico, sendo dada prioridade de publicação a artigos de Sócios da Sociedade Portuguesa de Bioanalistas Clínicos (SPBS). Os trabalhos publicados passam a ser propriedade da RB, e não poderão ser reproduzidos no todo ou em parte sem a autorização da Direcção da Revista.

Responsabilidade de Autoria e Transferência de Direitos de Autor

A RB considera todos os autores responsáveis pelo conteúdo do artigo, por isso deve ser enviado conjuntamente o documento **Checklist para autores**, completamente preenchido.

Categorias de Artigos

Editoriais – 1000 palavras no máximo; até 20 referências; resumo não estruturado até 100 palavras.

Artigos Originais – 5000 palavras no máximo; até 5 palavras-chave; resumo não estruturado até 250 palavras.

Artigos de Revisão – 5000 palavras no máximo; até 5 palavras-chave; resumo não estruturado até 250 palavras.

Notas de Investigação (Comunicações Breves) – 1000 palavras no máximo; até 20 referências; resumo não estruturado até 100 palavras; máximo 2 tabelas ou ilustrações.

Formação Continuada – 5000 palavras no máximo; até 5 palavras-chave; resumo não estruturado até 250 palavras.

Correspondência (Cartas ao Director/Editor) – referentes a material publicado recentemente na RB).

Resumos de comunicações/pósteres – trabalhos apresentados em reuniões científicas.

A categoria do artigo pode eventualmente mudar durante o processo de revisão.

Apresentação do Texto

A primeira página deve conter o Título do Artigo, que deve dar uma indicação do tema em estudo, e não ser uma afirmação de conclusões. Os nomes e graus profissionais dos Autores, os respectivos Serviços e os Agradecimentos devem ser fornecidos em página separada para garantir a Revisão Anónima. A RB permite que os autores optem pela submissão de artigos em Português ou em Inglês, contudo todos devem conter Título e Resumo redigidos em Português e em Inglês, devendo ser propostas palavras-chave em ambas as línguas, para Indexação em Bases de Dados. Os artigos devem ser redigidos a 2 espaços (parágrafo) com uma margem de 3 cm em todos os lados, começando cada secção ou componente no início de uma página. As figuras e tabelas deverão ser apresentados separadamente do texto, com a respectiva numeração e legenda, e em ficheiros separados. Os Artigos Originais deverão ser estruturados da seguinte forma: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão. Deve ser nomeado um autor para correspondência, incluindo morada completa, telefone e email. Os documentos deverão ser enviados para spbsgeral@gmail.com.

Ilustrações e Figuras

Qualquer imagem composta por linhas e texto, como gráficos, tabelas e ilustrações, devem ser guardados em EPS (Encapsulated PostScript). Ficheiros de Bitmap devem ser guardados como TIFF 800 dpi (Tagged image format files).

Tabelas

Quando possível devem ser preparadas como texto, usando

“tabs” para alinhar colunas. Evitar o uso de editores de tabelas. Abreviaturas podem ser usadas, mas devem ser explicadas em legenda. As unidades de medida devem ser claramente indicadas.

Considerações Éticas

Artigos de Investigação envolvendo humanos, devem incluir uma declaração na Secção Material e Métodos, em como foi obtido o Consentimento Informado, assim como a aprovação por uma Comissão de Ética, de acordo com a Declaração de Helsínquia.

Processo de Revisão e Informação aos Autores

O número de revisores por artigo será de dois. Após revisão, se forem propostas alterações, os autores terão trinta dias para entregar uma versão corrigida. Após Aceitação/Rejeição do artigo os autores serão informados por email. Todos os autores com Artigos Aceites receberão um ficheiro PDF (prova) com a versão final do artigo para uso pessoal.

Referências Bibliográficas

Deverão ser enumeradas segundo a ordem de citação no texto (e não alfabeticamente), usando números árabes dentro de parêntesis. Todos os autores devem ser citados se forem em número igual ou inferior a seis. Se forem sete ou mais, devem ser enunciados os primeiros seis seguidos da expressão, *et al.* Exemplos – segundo “ICMJE Recommendations”

Artigos de Revistas

1. Artigo padrão:

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996; 124:980-3.

2. Organização/Instituição como autor:

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 164:282-4.

3. Volume com suplemento:

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-82.

4. Volume com parte:

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995; 32 (Pt 3):303-6.

Livros e outras Monografias

1. Autor(es) individual:

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

2. Editor(es), compilador, como autor:

Norman LJ, Redfern SJ, eds. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

3. Capítulo de um livro:

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

4. Livro de actos de conferência, congresso, encontro:

Kimura J, Shibasaki H, eds. Recent advances in clinical neurophysiology. *Proceedings of the 10th Int. Cong. of EMG and Clinical Neurophysiology*; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

bioanálise

PUBLICAÇÃO OFICIAL DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE BIOANALISTAS CLÍNICOS

Director Científico

Francisco Oliveira Freitas

Director Científico Adjunto

José Machado Eduardo

Conselho Científico

Abel Antunes Ferreira, Guarda
Altina Ramos Lopes, Porto
António Aleixo Martins, Coimbra
António João Metello, Coimbra
Célia Rodrigues Bettencourt, Lisboa
Cristina Caldas Peres, Lisboa
Dalila Ferreira Patrício, Coimbra
Fátima Pinto Monteiro, Porto
Francisco Barbas Rodrigues, Castelo Branco
José Alípio Simões, Coimbra
Marisa Reduto Barbeira, Castelo Branco
Rogério Barreira, Coimbra
Sandra Teixeira Pereira, Porto
Sílvia Tadeu Pires, Porto
Sónia Graziela Rocha, Porto
Susana Almeida Santos, Coimbra
Vânia Cristina Oliveira, Lisboa

Director Geral

Moisés de Brito Correia Vaz

Director Financeiro

Luísa Helena Chaves Frias

Marketing, Distribuição e Publicidade

Ana Cristina Pinto
Fátima Alexandra Ferreira da Silva
Maria José Reis

**Propriedade, Administração,
Produção, Edição e Redacção**
Sociedade Portuguesa
de BioAnalistas Clínicos

Contactos da Redacção e Produção

Apt. 2009
3501-909 Viseu
Tlm: 966 931 470
E-mail: spbsgeral@gmail.com
Site: www.spbs.pt

Depósito Legal Nº 221837/05
ISSN 1646-1266

Design, Montagem e Impressão
Tip. Beira Alta, Lda. - Viseu

ÓRGÃOS SOCIAIS 2014 – 2016

DIRECÇÃO:

Presidente:

Moisés de Brito Correia Vaz

Vice-Presidente:

José Machado Costa Eduardo

Secretário:

Maria José Moreira Pires

Tesoureiro:

Luísa Helena Chaves Frias

Vogais:

Fátima Alexandra Ferreira da Silva
Helena Isabel L. Morais
Inês Marília Ferreira Pinto
Maria José Alves dos Reis
Raquel Sofia Ladeira Rodrigues

ASSEMBLEIA GERAL

Presidente:

António Cândido Almeida Teixeira

Vice-Presidente:

Francisco Manuel Teixeira Soares

Secretário:

Carina Pereira Oliveira

Suplentes:

Maria Gabriela Gomes Ribeiro Rebelo
Maria Manuela Cunha Azevedo Costa Silva

CONSELHO FISCAL

Presidente:

Teobaldo António de Figueiredo Correia Simões

Redactores:

Ana Cristina Fonseca Pinto
Ana Maria Abreu Oliveira

Suplente:

Ana Elena C. Taboada

Í N D I C E

editorial

What's New About Sample Quality in Routine Coagulation Testing? 5

FRANCISCO FREITAS

Serviço de Pat. Clínica, Centro Hospit. Tondela-Viseu, Escola Sup. de Saúde Dr. Lopes Dias, Inst. Politécnico de Castelo Branco

artigo original / original article

Avaliação de Dois Testes Rápidos para Pesquisa de Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B e de Anticorpos Contra o Vírus da Hepatite C 8

CARLA MANITA FERREIRA, JOÃO ALMEIDA SANTOS, TERESA LOURENÇO, HELENA CORTES MARTINS

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Laboratório de Imunologia

formação continuada / continuing education

Leucemia Linfoblástica Aguda: Diagnóstico Laboratorial, Características Epidemiológicas e Clínicas, Prognóstico e Tratamento 14

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

²Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

Diagnóstico Laboratorial de Tricoleucemia 23

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

²Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

What's New About Sample Quality in Routine Coagulation Testing?

FRANCISCO FREITAS

Serviço de Pat. Clínica, Centro Hospit. Tondela-Viseu, Escola Sup. de Saúde Dr. Lopes Dias, Inst. Politécnico de Castelo Branco

Today, laboratories are very much different than they were decades ago. They have improved instruments to work with, multiple off-site collection points, more competent personnel, a greater analyte panel and quality requirements for those analytes. Nevertheless, sample quality has to be assured along the total testing process (TTP) in order to guarantee reliable results to the patient. In routine coagulation, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen (Fbg) and D-dimer are the essential part of the test panel, for which new evidences about sample quality requirements have been presented in recent years.

What's new about patient preparation?

To fast or not to fast is a much discussed topic in laboratory medicine these days (1). Apart from those discussions, we must take in consideration that reference intervals and biological variation data are derived from fasting individuals (2), and so patient test results should in theory be compared in the same manner.

In hemostasis, the most recent evidence (3), have shown that a standardized morning light meal has no clinical significant influence on test results (PT, APTT, Fbg, AT, PC and PS) as compared with reference change value (RCV). Despite that, significant statistical lipemia interference was observed after one hour for several analytes (APTT, PT, AT and PC), even though it wasn't detected by visual inspection. As laboratories have no control over what people eat in the morning, and the great majority of test requests also include other tests with fasting requirement, the wisest move is to instruct patients to fast.

In clinical settings such as emergency department or oral anticoagulant therapy (with blood collection

after lunch), clearly lipemic samples are more prone to occur and leading to erroneous results (4). What to do in such occasions? To postpone the analysis and collect a novel sample later or in the fasting state is always the best option. Where this is not feasible, interference removal can be attempted, either by ultracentrifugation (5), dilution or extraction, each one having its drawbacks (4,6).

What's new about sample collection?

Phlebotomy is a highly variable procedure, because it depends on many factors such as the patient condition, the more or less controlled setting of execution (outpatient vs inpatient vs emergency departments), the skill of the healthcare professional, and the material choice (evacuated vs non-evacuated tubes; straight needle vs butterfly devices vs IV starts).

One of the main questions frequently arising in the moment of phlebotomy is the tube order of draw. Currently, CLSI GP41-A6 - *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture* (7), recommends that coagulation tubes should be drawn after blood culture bottles (if they are requested) and before non-additive tubes and clot activators (for serum), sodium heparin, lithium heparine, EDTA, acid-citrate-dextrose and oxalate/fluoride tubes (for whole blood). This so called "order of draw" has been established to prevent test result errors due to cross-contamination from tube additives.

However, Indevuyst *et al* (8) have found no significant influence at least for PT/INR and APTT values (measured in Sarstedt S-monovette tubes), if the citrate tube is obtained after a heparin, EDTA or a serum tube with clot activator. In a similar line of investigation, Salvagno *et al* (9) demonstrated

that chemistry parameters (potassium, sodium, calcium, magnesium, and Phosphorus) that are more likely to be biased by cross-contamination of ion-chelating additives (EDTA and sodium citrate), are instead not affected by the order of draw of serum tubes (Venosafe, Terumo Europe). Both of these observations add to the evidence that the order of draw is no longer a requirement in coagulation testing.

Another issue in phlebotomy is the tube filling, which ideally is made up to the indicated mark. Though, underfilled tubes are a frequent finding (10, 11) in routine coagulation testing, and laboratories should have procedures to deal with these kind of samples. CLSI recommends a minimum of 90% tube filling if APTT is to be tested (12), and recent evidence by Lippi *et al* (13) and Ver Elst *et al* (14) still support this recommendation. For PT and Fbg Lippi *et al* (15) found the minimum allowed threshold to be >61% and >71% filling respectively, while Ver Elst *et al* (14) determined a 73% and 63% filling threshold. In a similar study, Pretorius *et al* (16) recommended as safe in their setting an 80% fill volume for complete routine testing. Different analytical platforms and tubes might explain the slight differences encountered, which puts in evidence the need for blood tubes validation by laboratories, as highlighted by Lima-Oliveira *et al* (17).

For specialized coagulation tests, the available evidence addressing the influence of different blood volumes is scarce. In one study, Lippi *et al* (13) found that for activated protein C resistance (APCR) a blood volume as low as 67% has no clinical significance on test results, while for FVIII it is advisable to obtain at least 80%.

What's new about sample stability – time to analysis?

With the consolidation era in laboratory medicine, more samples are collected in outside facilities, leading to possible delays in sample testing, so being aware of sample stability is key in coagulation testing. The issued recommendation by CLSI (H21-A5) on sample stability states that the assays should be completed, mostly within 4 hours of collection, except for PT (24h maximum), either on unc centrifuged or centrifuged samples kept at room temperature. Although this is a more conservative and safer approach, accumulated

evidence in recent years suggests that proper measurements (without clinical significant difference) can still be made within a 24h frame not only for PT, but also for Fbg, D-dimers and thrombin time (TT) in samples transported/stored at room temperature and interestingly also at 4°C (18-23). For APTT the evidence also suggests that storage can be extended, in this case up to 6-8 hours before testing (18-21, 23-25), both at room temperature and 4°C.

What's new about testing interference in hemostasis?

Hemolysis interference is the leading cause of specimen rejection in coagulation laboratories (6), which is in agreement with CLSI recommendations (H21-A5) not to test samples with visible hemolysis. However, the evidence on the effects of spurious hemolysis on routine coagulation testing not only is scarce, but currently conflicting, because two recent studies (with updated measurement instruments) by Arora *et al* (26) and Lippi *et al* (27) concluded that the results obtained from hemolyzed samples for PT/INR, APTT and Fbg were reliable and would not change the clinical interpretation when compared with non-hemolyzed samples, which adds to the observations of Laga *et al* back in 2006 (28). D-dimer assays seem not to be affected by hemolysis even in the presence of high concentrations of cell-free haemoglobin (29, 30)

From the current state of the art we can conclude that sample quality requirements for routine coagulation testing are evolving, and it seems essential that laboratories have updated and validated criteria on specimen acceptance/rejection, in order to avoid rejecting good specimens, reduce costs and delays, and improve patient safety.

REFERENCES

1. Guidi GC, Simundic AM, Slavagno GL, Aquino JL, Lima-Oliveira. To avoid fasting time, more risk than benefits. *Clin Chem Lab Med* 2014; doi: 10.1515/cclm-2014-1013. [Epub ahead of print]
2. Pineda-Tenor D, Laserna-Mendieta EJ, Timón-Zapata J, Rodelgo-Jiménez L, Ramos-Corral R, Recio-Montealegre A, Reus MG. Biological variation and reference change

- values of common clinical chemistry and haematologic laboratory analytes in the elderly population. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(4):851-62.
3. Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Lippi G, Danese E, Gelati M, Montagnana M, Picheth G, Guidi GC. Could light meal jeopardize laboratory coagulation tests? *Biochem Med* 2014; 24(3):343-9.
 4. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med* 2014; 24(1):57-67.
 5. Clinical Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP7-A2. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005.
 6. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(3):258-66.
 7. Clinical Laboratory Standards Institute. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. CLSI H3-A6 document. 6th ed. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2007.
 8. Indevuyst C, Schuermans W, Bailleul E, Meeus P. The order of draw: much ado about nothing? *Int J Lab Hematol* 2015; 37(1):50-5.
 9. Salvagno G, Lima-Oliveira G, Brocco G, Danese E, Guidi GC, Lippi G. The order of draw: myth or science? *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(12):2281-5.
 10. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 2007; 53(7):1338-42.
 11. Djordjevic A, Milinkovic N, Dopsaj V, Ignjatovic S. Evaluation of preanalytical errors in prothrombin time tests including hemolysis, lipemia, icterus and insufficient or clotted specimens. 2nd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase. *Biochem Med* 2013; 23(1):A8-A9.
 12. Clinical and Laboratory Standard Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline. 5th ed. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
 13. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6):565-75.
 14. Ver Elst K, Vermeiren S, Schouwers S, Callebaut V, Thomson W, Weekx S. Validation of the minimal citrate tube fill volume for routine coagulation tests on ACL TOP 500 CTS®. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(6):614-9.
 15. Lippi G, Salvagno GL, Lima-Oliveira G, Funk-Adcock DM, Guidi GC, Favaloro EJ. Experimental study of blood tubes underfilling for routine coagulation. 2nd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase. *Biochem Med* 2013; 23(1):A2.
 16. Pretorius L, Janse van Rensburg WJ, Conradie C, Coetzee MJ. Minimum citrate tube fill volume for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2014; 36(4):493-5.
 17. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Picheth G, Guidi GC. Sodium citrate vacuum tubes validation: preventing preanalytical variability in routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24(3):252-5.
 18. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008; 99(2):416-26.
 19. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009; 31(4):462-7.
 20. Feng L, Zhao Y, Zhao H, Shao Z. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014; 4:3868.
 21. Kemkes-Matthes B, Fischer R, Peetz D. Influence of 8 and 24-h storage of whole blood at ambient temperature on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, thrombin time, antithrombin and D-dimer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011; 22(3):215-20.
 22. Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6):576-85.
 23. Zhao Y, Lv G. Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(5):566-70.
 24. Wang BL, Guo WL, Pan BSH. Influence of storage time at room temperature on routine coagulation tests. *Chin J Lab Med* 2011; 34:595-7.
 25. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem* 2012; 45(6):464-9.
 26. Arora S, Kolte S, Dhupia J. Hemolyzed Samples Should be Processed for Coagulation Studies: The Study of Hemolysis Effects on Coagulation Parameters. *Ann Med Health Sci Res* 2014; 4(2):233-7.
 27. Lippi G, Ippolito L. Interference of spurious haemolysis on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen. *N Z J Med Lab Sci* 2014; 68(2):52-4.
 28. Laga AC, Cheves TA, Sweeney JD. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(5):748-55.
 29. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(2):181-4.
 30. Lippi G, Avanzini P, Zobbi V, Ippolito L. Influence of mechanical hemolysis of blood on two D-dimer immunoassays. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23(5):461-3.

Avaliação de Dois Testes Rápidos para Pesquisa de Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B e de Anticorpos Contra o Vírus da Hepatite C

CARLA MANITA FERREIRA*, JOÃO ALMEIDA SANTOS, TERESA LOURENÇO, HELENA CORTES MARTINS

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Laboratório de Imunologia

RESUMO

Os testes rápidos para pesquisa de marcadores de hepatites víricas podem desempenhar um papel importante no rastreio destas infeções, com um impacto considerável em termos de saúde pública. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de dois testes rápidos, um para deteção do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (AgHBs) e outro para deteção de anticorpos contra o vírus da Hepatite C (anti-VHC).

Foram avaliados os testes Rapidan® Tester HBsAg e Rapidan® Tester Anti-VHC da Türklab, pelo método de imunocromatografia em fase sólida. O estudo envolveu 50 soros para cada teste: 28 soros positivos e 22 negativos para o AgHBs e 27 amostras positivas e 23 negativas para os anticorpos anti-VHC. Todas as amostras foram previamente estudadas por ensaio imunoenzimático de micropartículas (*Abbott AxSYM® HCV 3.0* e *HBsAg v2.0*). Como teste confirmatório para os anticorpos anti-VHC utilizou-se o método RIBA (*INNO-LIA HCV Score™*).

A deteção do AgHBs pelo teste rápido revelou especificidade e valor preditivo positivo (VPP) de 100,0%, sensibilidade de 85,7% e valor preditivo negativo (VPN) de 84,6%, tendo ocorrido quatro resultados falsos negativos.

O ensaio para deteção de anticorpos anti-VHC apresentou três resultados falsos negativos, o que conduziu a uma sensibilidade de 88,9%, VPN de 88,5%, especificidade e VPP de 100,0%.

Os testes rápidos têm um lugar importante no rastreio de doenças infecciosas pela facilidade de execução e implementação, no entanto, como refletem os resultados obtidos, o seu uso deve ser criterioso.

Palavras-chave: Testes rápidos • VHC • VHB • Rastreio

Aceite para publicação em 27 de Março de 2015

ABSTRACT

Rapid tests for detection of viral hepatitis markers are useful as screening of these infections. The aim of this study was to assess the performance of two rapid tests, one for Hepatitis B surface antigen (HBsAg) detection and another for Hepatitis C antibodies detection.

The evaluated tests, Rapidan® Tester HBsAg and Rapidan® Tester Anti-HCV by Türklab, used solid phase immunochromatography technology. The study was performed on 50 sera samples for each assay: 28 positive samples and 22 negative samples for HBsAg and 27 positive sera samples and 23 negative sera samples for HCV antibodies. These samples were previously tested by an immunoenzymatic assay (*Abbott 3.0 AxSYM® HCV* and *HBsAg v2.0*). RIBA (*INNO-LIA HCV Score™*) was used as confirmatory test for anti HCV antibodies.

* Correspondência:

Carla Manita Ferreira, Instituto Ricardo Jorge, Av. Padre Cruz – 1649-016 Lisboa, Laboratório Imunologia Microbiana – Departamento de Doenças Infecciosas, Tel: 21 751 92 09 – E-mail: carla.manita@insa.min-saude.pt

The performance analysis for HBsAg rapid test showed a specificity and positive predictive value of 100.0% while sensitivity remains in 85.7% and negative predictive value in 84.6% reflecting the occurrence of four false negative results.

The occurrence of three false negative results in HCV antibodies rapid test leads to a sensitivity of 88.9% and a negative predictive value of 88.5%. On the other hand, specificity and positive predictive value was 100.0%.

Rapid tests have an important role in the screening of infectious diseases because they are easy to perform and implement, however, as shown by the results in the present study, their use must be judicious.

Key-word: Rapid tests • HCV • HBV • screening

Accepted for publication: 27th March 2015.

INTRODUÇÃO

O vírus da Hepatite B (VHB) é um vírus de ADN, hepatotrópico, pertencente à família *Hepadnaviridae*. As principais formas de transmissão do vírus são a via sexual e parentérica. Outras vias de transmissão, embora menos frequentes, são a transfusão, a transplantação de órgãos ou a exposição ocupacional (1).

A infeção por VHB caracteriza-se por ser assintomática em cerca de 50 a 70% dos casos². Em, aproximadamente, 90% dos adultos e 10% das crianças, a infeção aguda evolui espontaneamente para a cura². Entre 2 a 10% dos casos, a infeção evolui para a cronicidade com desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular e cerca de 1% podem apresentar hepatite fulminante (2). O volume do inóculo infetante, a via de transmissão e a idade do hospedeiro são fatores importantes e que se correlacionam com a gravidade da doença hepática aguda ou crónica.

O vírus VHB tem uma distribuição geográfica mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) aproximadamente 30% da população mundial

é seropositiva para o vírus da hepatite B, estimando-se que 350 milhões de pessoas sejam portadores crónicos e mais de 500 000 pessoas morram, anualmente, de doença hepática aguda ou crónica, associada ao VHB (2,3). Em Portugal, de acordo com o estudo efetuado por Lecour em 1979/80, estimou-se uma prevalência de 1% (4). Mais recentemente, no 2º Inquérito Serológico Nacional em Portugal Continental, realizado em 2001/02, a prevalência foi de 0,36% (5). A introdução da vacina para VHB, no ano 2000, no Plano Nacional de Vacinação foi uma medida importante na prevenção da infeção e conduziu a uma descida da incidência de novos casos. No entanto, a infeção por VHB contribui largamente para que as hepatites víricas continuem, em Portugal, a ser a segunda maior causa de doença hepática (6).

O vírus da Hepatite C (VHC) é um vírus de ARN de cadeia simples, da família dos *Flaviviridae*. Apesar da estrutura básica ser comum, existem pelo menos seis variantes diferentes de VHC com perfis genéticos (genótipos) distintos. A diferenciação por genótipo é clinicamente relevante, pois cada genótipo responde de forma diferente à terapêutica. Esta diversidade genética é uma das principais razões da dificuldade em desenvolver uma vacina eficaz que proteja contra todos os genótipos circulantes.

A principal forma de transmissão de VHC é a exposição percutânea a sangue infetado (via parentérica), através, por exemplo, da partilha de agulhas contaminadas (7). Outras vias de transmissão, embora menos frequentes, são a via sexual, perinatal, transfusão, transplantação de órgãos ou exposição ocupacional (7).

A hepatite C é conhecida como a “epidemia silenciosa”, visto que a maioria dos indivíduos são assintomáticos, ou apresentam sintomas moderados e inespecíficos, durante um longo período de tempo (20 a 40 anos) (8) e tem tendência para a cronicidade. Dados estatísticos implicam o VHC em 20% dos casos de hepatite aguda, 70% dos casos de hepatite crónica, 40% dos casos de cirrose hepática, 60% dos casos de carcinoma hepatocelular e 30% dos transplantes hepáticos realizados em países desenvolvidos (9). Segundo a OMS, cerca de 3% da população mundial, mais

de 170 milhões de indivíduos, estão infetados pelo VHC, o que constitui uma verdadeira pandemia viral (10). A Associação Europeia para o Estudo do Fígado calcula que na Europa a prevalência do VHC oscile entre 0,5% (Norte) e 2% (Sul) (11). A prevalência nos utilizadores de drogas injetáveis é quase epidémica, com cerca de 80% infetados, sendo esta prevalência idêntica em todo o mundo industrializado (11). Em Portugal não existem dados concretos sobre a prevalência nacional, mas estima-se que esta ronde os 1,5% (12). Estes dados dão uma ideia da verdadeira dimensão do problema e do seu impacto social e económico nas estruturas de saúde.

Constatando-se assim que as hepatites B e C são graves problemas de saúde pública e que o seu diagnóstico é um passo essencial no controlo e, em última instância, na erradicação destas infeções, reveste-se de suma importância a avaliação de desempenho de qualquer dispositivo de diagnóstico.

O diagnóstico laboratorial de hepatite B e C é maioritariamente realizado através da pesquisa de marcadores serológicos por métodos imunoenzimáticos. As técnicas de biologia molecular surgem como métodos confirmatórios, permitindo ainda acompanhar a evolução da doença e monitorizar a eficácia da terapêutica. De comprovada sensibilidade e especificidade, todas estas metodologias, implicam a existência de infraestruturas laboratoriais, bem como recursos humanos e técnicos que tornam a sua utilização menos versátil.

Os testes rápidos, pela sua facilidade de execução e relativo baixo custo, são bons auxiliares no rastreio de doenças infecciosas, particularmente em comunidades ou grupos populacionais fechados.

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de dois testes rápidos, um para deteção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) e outro para deteção de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-VHC).

MATERIAL E MÉTODOS

Na avaliação do teste rápido para a deteção de AgHBs, foram utilizadas 50 amostras de soro de diferentes indivíduos, dos quais 38 (76,0%) do

género masculino e 12 (24,0%) do género feminino, com idade média de 38 anos, variando entre 20 e 64 anos (**figura 1**).

Em relação à avaliação do teste rápido para deteção de anticorpos anti-VHC, foram igualmente utilizadas 50 amostras de soro de diferentes indivíduos, dos quais 27 (54,0%) do género masculino e 23 (46,0%) do género feminino, com idade média de 40 anos, variando entre 8 e 69 anos (**figura 1**). Foram utilizadas amostras de soro diferentes na avaliação de cada um dos testes rápidos, pelo que, em termos globais, foram estudadas, no presente trabalho, 100 amostras de soro.

O critério de seleção das amostras foi o de conveniência e, especialmente no caso dos soros positivos, de disponibilidade, razão pela qual foram utilizados mais soros de indivíduos do género masculino na avaliação do teste rápido para AgHBs (76,0% vs 24,0%).

Foi possível agrupar as amostras de acordo com comportamentos de risco para as infeções em estudo em dois grupos populacionais diferentes (**figura 2**): grupo sem comportamentos de risco identificados e grupo com comportamentos de risco (utilização de drogas injetáveis). Dos soros testados para AgHBs, 22 (44,0%) pertenciam ao grupo sem comportamentos de risco e 28 (56,0%) ao grupo com risco. No estudo do teste rápido para pesquisa de anticorpos anti-VHC, 29 (58,0%) provinham do grupo sem comportamentos de risco e 21 (42,0%) do grupo com risco.

As amostras foram previamente ensaiadas por método imunoenzimático de micropartículas ou

Figura 1 – Distribuição por género (F - Feminino e M - Masculino) e idade das amostras em estudo.

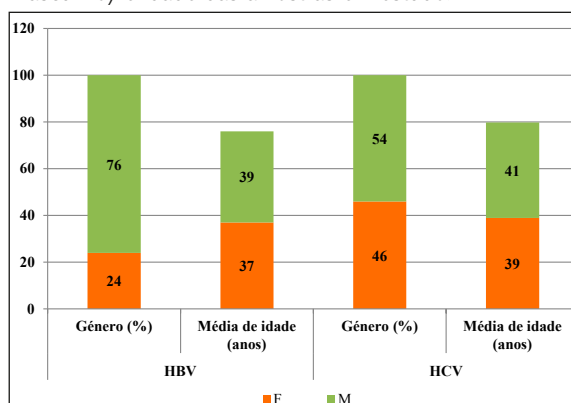
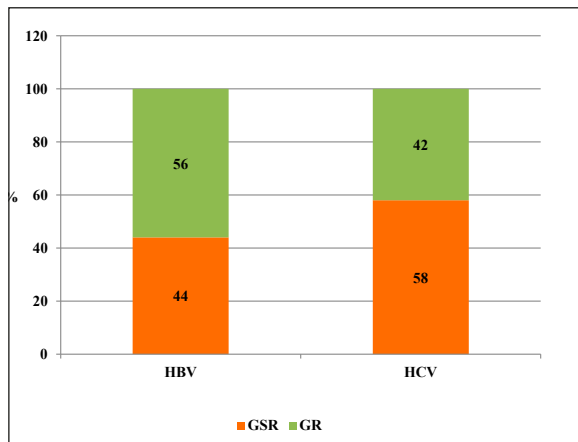


Figura 2 – Distribuição dos soros utilizados na deteção de AgHBs e de anticorpos anti-VHC de acordo com o grupo populacional: grupo sem comportamentos de risco identificados (GSR) e grupo com comportamentos de risco (GR).



MEIA (Abbott AxSYM® VHC 3.0 e HBsAg v2.0; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) para os parâmetros em estudo, resultando em 28 amostras positivas e 22 negativas para o AgHBs e 27 amostras positivas e 23 negativas para os anticorpos anti-VHC.

Como teste confirmatório, para resultados indeterminados ou fracamente reativos, para a deteção de anticorpos anti-VHC foi utilizado o método *Recombinant Immunoblot Assay* ou RIBA (INNO-LIA™ VHC Score; Innogenetics, Belgium). Este é um ensaio imunoenzimático em linha de 3ª geração que incorpora antigénios VHC derivados da região do core, da região E2 hipervariável (região estrutural), e das regiões não-estruturais (NS): região NS3 helicase e regiões NS4A, NS4B e NS5A impregnados em 6 bandas distintas numa tira de nylon.

Os testes rápidos avaliados utilizam um método de imunocromatografia em fase sólida para a deteção qualitativa do AgHBs (Rapidan® Tester HBsAg, Türklab Medical Devices Inc., Turkey) e de anticorpos anti-VHC (Rapidan® Tester Anti-VHC, Türklab Medical Devices Inc., Turkey). Estes testes estão validados para amostras de sangue total, soro ou plasma e a leitura dos resultados é realizada ao fim de 15 minutos.

O teste para deteção de AgHBs utiliza anticorpos monoclonais e policlonais dirigidos contra o antigénio

de superfície do vírus da hepatite B. Anticorpos anti-HBs monoclonais estão imobilizados numa área da membrana de nitrocelulose. O conjugado é composto por anticorpos anti-HBs monoclonais ligados a partículas coloidais impregnados na tira. Após adição da amostra e em presença do AgHBs, este liga-se inicialmente ao conjugado e é em seguida captado pelos anticorpos anti-HBs imobilizados na membrana, originando uma linha colorida.

O teste para deteção de anticorpos anti-VHC utiliza antigénios VHC recombinantes (core, NS3, NS4 e NS5) imobilizados numa membrana de nitrocelulose. Como conjugado são utilizados antigénios recombinantes ligados a partículas coloidais também impregnados em tira. Em presença de anticorpos anti-VHC na amostra, estes ligam-se ao conjugado e são fixados pelos antigénios recombinantes imobilizados na membrana, originando uma linha colorida.

As condições de armazenamento dos testes foram estritamente seguidas e todos foram executados de acordo com as instruções dos fabricantes.

RESULTADOS

Relativamente às amostras utilizadas no teste rápido para AgHBs, previamente estudadas pelo método imunoenzimático de micropartículas ou MEIA, 28 eram positivas para AgHBs (56,0%) e 22 negativas (44,0%). O teste rápido apresentou quatro resultados falsos negativos (14,3%), o que se traduziu numa sensibilidade de 85,7% (24/28), valor preditivo negativo (VPN) de 84,6% (22/26), especificidade de 100,0% (22/22) e valor preditivo positivo (VPP) de 100,0% (24/24), como consta nos quadros I e III.

Todas as amostras utilizadas na avaliação do teste rápido para anti-VHC (n=50) foram previamente ensaiadas por método MEIA, resultando em 12 amostras anti-VHC negativas e 38 positivas, das quais 14 com fraca reatividade (resultado muito próximo do limiar de positividade). As amostras que apresentaram fraca reatividade (n=14) foram ensaiadas pelo método RIBA, das quais 11 revelaram um resultado não reativo e três foram confirmadas como reativas. Para análise do desempenho do teste rápido associaram-se os resultados obtidos por

MEIA e por RIBA, assim sendo foram utilizadas 27 amostras anti-VHC positivas e 23 negativas.

O teste rápido para anti-VHC apresentou três resultados falsos negativos (11,1%), tendo por isso uma sensibilidade de 88,9% (24/27), VPN de 88,5% (23/26), especificidade de 100,0% (23/23) e VPP de 100,0 % (24/24), como figura nos quadros II e III.

Os resultados falsos negativos encontrados em ambos os testes apresentaram-se distribuídos de forma idêntica nos grupos populacionais com e sem risco identificado: no caso da pesquisa do AgHBs, dois resultados provinham do grupo com risco e dois do grupo sem risco; na deteção de anticorpos anti-VHC, um resultado do grupo com risco e dois do grupo sem risco.

Quadro I – Sumarização dos resultados obtidos nas amostras estudadas com o teste rápido para pesquisa de AgHBs (n=50) *versus* resultados esperados.

Teste rápido vs MEIA		MEIA		Total
		Positivo	Negativo	
Teste rápido (AgHBs)	Positivo	24	0	24
	Negativo	4	22	26
	Total	28	22	50

Quadro II – Sumarização dos resultados obtidos nas amostras estudadas com o teste rápido para pesquisa de anti-VHC (n=50) *versus* resultados esperados.

Teste rápido vs MEIA/RIBA		MEIA/RIBA		Total
		Positivo	Negativo	
Teste rápido (anti-VHC)	Positivo	24	0	24
	Negativo	3	23	26
	Total	27	23	50

Quadro III – Resumo das características de desempenho dos testes avaliados.

Teste Rápido	AgHBs (%)	Anti-VHC (%)
Sensibilidade	85,7	88,9
Especificidade	100,0	100,0
Valor preditivo positivo	100,0	100,0
Valor preditivo negativo	84,6	88,5

DISCUSSÃO

As amostras foram selecionadas de forma a obter dois grupos populacionais distintos, um grupo sem comportamentos de risco identificados e um grupo com comportamento de risco identificado, nomeadamente, utilizadores de drogas injetáveis. Esta diferenciação prende-se com o facto de os soros provenientes de grupos de risco poderem apresentar alterações que interferem no correto desempenho das metodologias laboratoriais, quer em termos das características da amostra (p.ex. soros hemolisados, lipémicos) (13) quer pelas alterações imunológicas comumente associadas a estes grupos (14,15). Contudo, em nenhum dos grupos foram encontrados resultados falsos positivos e os resultados falsos negativos obtidos apresentaram-se distribuídos de forma semelhante, em ambos os grupos populacionais estudados, pelo que não se observou correlação entre grupo populacional e a ocorrência de resultados discrepantes.

Nos testes serológicos “convencionais” são exigidas sensibilidade e especificidade máxima ou muito próxima dos 100,0%, de forma a serem utilizados com segurança não só em diagnóstico mas também no rastreio das dádivas de sangue (16).

Nos testes rápidos, cuja aplicação é essencialmente na ótica do rastreio, poderá esperar-se uma especificidade inferior, uma vez que os resultados positivos deverão ser confirmados obrigatoriamente por metodologias mais sensíveis e específicas, mas uma prestação idêntica no que respeita à sensibilidade. No entanto, não foi o que se verificou nos testes rápidos avaliados. Pelo contrário, como é possível constatar nos quadros I, II e III, os dois testes apresentaram uma especificidade e VPP elevados (100,0%), mas a ocorrência de resultados falsos negativos em ambos os parâmetros levou a que os valores de sensibilidade e VPN fossem inferiores a 100,0%. Estudos que avaliaram outros testes rápidos (17,18) para estes marcadores de hepatite, obtiveram valores de sensibilidade semelhantes ou mesmo inferiores.

Pela sua facilidade de implementação e execução, os testes rápidos têm um lugar importante no rastreio de doenças infecciosas. No entanto, e tendo por base os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que

a utilização de testes rápidos deve ser criteriosa, não devendo ser considerados substitutos de metodologias comprovadamente mais sensíveis mas sim auxiliares no, por vezes, problemático processo de diagnóstico.

Estas conclusões encontram fundamento quer nos resultados de sensibilidade obtidos na presente avaliação (85,7% para pesquisa de AgHBs e 88,9% para determinação de anti-VHC) quer pelos resultados

descritos em outros estudos, onde a sensibilidade obtida foi igualmente inferior ao expetável.

Estudos adicionais, envolvendo uma amostragem mais abrangente, devem ser realizados de forma a melhor estabelecer quais os critérios necessários à correta implementação e utilização dos testes rápidos no auxílio do diagnóstico das hepatites víricas, que permanecem um grave problema de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- Trépo C, Chan H L Y, Lok A. Hepatitis B virus infection, *Lancet* 2014, 384(9959):2053-63.
- World Health Organization. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services: management guidelines. Geneva, Switzerland: WHO, 2001.
- Mota A, Areia J, Cardoso MF. A expressão genotípica do Vírus da Hepatite B em Portugal e no mundo. *Acta Med Port* 2011; 24(4):587-94.
- Lecour H. Hepatite vírica: epidemiologia e diagnóstico (Tese de Doutoramento). Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 1983.
- Direcção Geral da Saúde. Avaliação do Programa Nacional de Vacinação - 2º Inquérito Serológico Nacional 2001-2002. Ministério da Saúde 2004: 123-145.
- Cortes-Pinto H, Marques-Vidal P, Monteiro E. Liver disease related admissions in Portugal: clinical and demographic pattern. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16(9): 873-7.
- Alter MJ. HCV Routes of transmission: what goes around comes around. *Semin Liver Dis* 2011;31(4):340-6.
- Alter H, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000; 20(1): 17-35.
- EASL. International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30:956-61.
- World Health Organization. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72: 341-48.
- Rui Marinho. Burden Hepatologia. Alto Comissariado da Saúde. Plano Nacional de Saúde 2012-16.
- Anjo J, Café A, Carvalho A, Doroana M, Fraga J, Gíria J, Marinho R, Santos S, Velosa J. O impacto da hepatite C em Portugal. *GE – Port J Gastrenterol* 2014; 21(2):44-54.
- Span PN, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot J, Sweep C. Screening for Interference in Immunoassays. *Clin Chem* 2003; 49(10):1708-9.
- Weber T.H, Käpyaho KI, Tanner P. Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry. A review. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1990; 201:77-8.
- Ismail AA. Interference from endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratorians need to know. *J Clin Pathol* 2009; 62:673-8.
- Nick S, Scheiblaue H. Sensitivities of CE-Marked HIV, HCV, and HBsAg Assays. *J Med Virol* 2007; 79:S59-S64
- Kaur H, Dhanoo J, Oberoi A. Evaluation of rapid kits for detection of HIV, HBsAg and HCV infections. *Indian J Med Sci* 2000; 54:432-4.
- Khan JK et al. Evaluation of the performance of two rapid immunochromatographic tests for detection of hepatitis B surface antigen and anti HCV antibodies using ELISA tested samples. *Annals of King Edward Medical University Special Edition* 2010; 16(1):84-7.

Leucemia Linfoblástica Aguda: Diagnóstico Laboratorial, Características Epidemiológicas e Clínicas, Prognóstico e Tratamento

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA^{1*}

1 Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal
2 Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

RESUMO

A Leucemia Linfoblástica Aguda é uma doença hematológica caracterizada pela proliferação de células linfóides imaturas na medula óssea, sangue periférico, e outros órgãos, e constitui a doença maligna mais comum da infância. Este artigo apresenta como principais objetivos descrever as características epidemiológicas e clínicas, os fatores de valor prognóstico, e os esquemas de tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda, assim como caracterizá-la segundo o seu diagnóstico laboratorial. O diagnóstico da LLA depende essencialmente da avaliação morfológica da medula óssea, imunofenotipagem por citometria de fluxo e avaliação de alterações citogenéticas. O estudo laboratorial inicial deve incluir o hemograma, esfregaço de sangue periférico, estudo de marcadores bioquímicos e estudos da coagulação sanguínea.

Palavras-chave: Leucemia Linfoblástica Aguda • Diagnóstico Laboratorial.

Aceite para publicação a 09 de Abril de 2015.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia is the most common malignancy in childhood, and is characterized by the

* Correspondência:

Marisa Barbeira, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Avenida do Empresário, Campus da Talagueira, 6000-767 Castelo Branco, Portugal, Tel.: +351 272 340 560, E-mail: marisabarbeira@ipcb.pt

proliferation of immature lymphoid cells in the bone marrow, peripheral blood and other organs. The main objectives of this article were to describe the epidemiological and clinical characteristics, prognostic factors, and treatment regimens of Acute Lymphoblastic Leukemia, as well as to characterize it according to its laboratory diagnosis. Its diagnosis depends essentially on the bone marrow analysis, flow cytometry immunophenotyping and cytogenetic analysis. Initial laboratory studies should include the complete blood count, peripheral blood smear, study of biochemical markers and blood coagulation.

Key-Words: Acute Lymphoblastic Leukemia • Laboratory Diagnosis.

Accepted for publication: 9th April 2015.

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma doença hematológica caracterizada pela proliferação de células linfóides imaturas na medula óssea, sangue periférico, e outros órgãos (1), e constitui a doença maligna mais comum da infância (2). O início e progressão desta patologia devem-se a mutações celulares sucessivas que aumentam a capacidade de renovação celular, diminuem a capacidade do controlo da proliferação normal, conduzindo a um bloqueio na diferenciação e aumento da resistência à apoptose (3). Na maioria dos casos de LLA o fator etioló-

gico é desconhecido (3). No entanto, vários fatores ambientais e genéticos são considerados fatores de risco, como a exposição a radiação, benzeno, alterações genéticas, entre outros (3,4).

Este trabalho apresentou como principais objetivos descrever as características epidemiológicas e clínicas, os fatores de valor prognóstico e os esquemas de tratamento da LLA, assim como caracterizá-la segundo o seu diagnóstico laboratorial.

2. METODOLOGIA

Efetuuou-se uma revisão bibliográfica, pretendendo estudar as características epidemiológicas e clínicas, fatores de valor prognóstico, esquemas de tratamento e metodologias de diagnóstico laboratorial da Leucemia Linfoblástica Aguda.

3. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

3.1. Epidemiologia

A LLA apresenta dois picos de incidência em termos de idade. O pico de incidência máxima ocorre entre os 2 e os 5 anos (5), sendo que 60% dos casos são encontrados em indivíduos com menos de 20 anos (1). Um segundo pico de incidência, menos pronunciado, inicia-se aos 40 anos (6). A prevalência de LLA infantil a nível mundial varia entre 1-9 casos por 100.000 habitantes, sendo diagnosticados cerca de 3.000-4.000 novos casos por ano nos Estados Unidos e 5.000 na Europa (5). Na maioria das faixas etárias, em especial em crianças dos 2 aos 3 anos, a incidência de LLA é superior em descendentes europeus em relação a descendentes africanos. Os picos de incidência estão ausentes em alguns países em desenvolvimento, sugerindo uma contribuição leucemogénica de alguns fatores associados à industrialização (3). A grande maioria dos casos de LLA (cerca de 85%) são de linhagem B (LLA-B), com uma incidência semelhante em ambos os sexos. Os restantes casos correspondem a LLA de linhagem T (LLA-T), nos quais se verifica uma predominância do sexo masculino (2).

3.2. Características clínicas

A maioria dos pacientes com LLA apresenta manifestações da patologia aquando do diagnóstico,

nomeadamente sintomas constitucionais (1,3). Os sintomas podem instalar-se de forma insidiosa ou aguda e refletem, geralmente, o grau da falência da medula óssea e o grau de disseminação extramedular (3). Aquando da apresentação clínica, os pacientes apresentam manifestações associadas à infiltração direta da medula óssea com consequentes citopenias, e/ou à infiltração de outros órgãos pelas células leucémicas (7).

Uma das manifestações mais frequentes (presente em mais de 50% dos pacientes) é a febre, mesmo sem qualquer outra indicação da presença de infeção (7), induzida por citocinas pirogénicas (como interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral) libertadas pelas células leucémicas (7). Outros sinais e sintomas de infeção também podem estar presentes através da neutropenia que torna os pacientes mais suscetíveis (7).

Entre as manifestações mais comuns associadas à infiltração da medula óssea encontram-se também os sinais e sintomas de anemia (fadiga, letargia, palidez) e trombocitopenia (petéquias, particularmente nas extremidades inferiores e membranas mucosas) (3,7).

Cerca de 10% dos pacientes apresentam coagulação intravascular disseminada aquando do diagnóstico podendo apresentar complicações trombóticas ou hemorrágicas (7).

A infiltração da medula óssea por um número excessivo de células leucémicas pode também conduzir a uma expansão da cavidade medular com infiltração do osso, periosteio e/ou articulações, levando a coxeados, dores ósseas, ou artralgias (3,7).

Os locais extramedulares mais envolvidos são o fígado, o baço, e os nódulos linfáticos, sendo que as organomegalias são mais pronunciadas nas crianças (3). Assim, os pacientes podem apresentar manifestações relacionadas à linfadenopatia, esplenomegalia (como saciedade precoce) e hepatomegalia (3).

Os pacientes com LLA-T podem apresentar sintomas relacionados com a presença de uma massa mediastinal, como dispneia ou disfagia (3). Menos frequentemente ocorre síndrome meníngea por infiltração do sistema nervoso central (SNC) (2,3).

3.3. Fatores com valor prognóstico

Vários fatores podem influenciar a evolução e o

prognóstico da LLA (2). Os principais indicadores de prognóstico estão descritos na **Tabela 1**.

3.4. Tratamento

A decisão do esquema de tratamento mais indicado para pacientes com LLA representa um dos programas mais complexos e intensivos na terapia oncológica (1). No entanto, apesar de o tratamento apresentar várias particularidades consoante as características do paciente e da própria patologia, os princípios do tratamento são similares. Assim, este divide-se em três etapas fundamentais: indução (destruição da maioria dos blastos leucémicos), consolidação (erradicação de quaisquer blastos residuais) e manutenção (prevenção de relapso) (1). A terapia de indução de remissão consiste na administração de Vincristina, Doxorubicina, e corticosteróides, com ou sem L-asparaginase ou e/ou Ciclofosfamida (1,2). A consolidação consiste na administração em altas doses de quimioterapia com múltiplos fármacos (com necessidade de terapia de suporte simultânea), nomeadamente Metotrexato, Citarabina, Mercaptopurina, e L-asparaginase (1,2). Por último, a manutenção baseia-se, na maioria dos casos, na administração diária de Mercaptopurina e semanal de Metotrexato durante 2 anos em adultos, e 2-3 anos em crianças (1,2).

Qualquer regime de tratamento deverá incluir, durante as várias fases, profilaxia e/ou tratamento de doença do SNC, que tem como objetivo aceder aos locais não acedidos pela quimioterapia. Estes podem consistir em irradiação craniana, quimioterapia in-

tratecal, e/ou quimioterapia sistémica de alta dose (1,2).

Os pacientes jovens com características de alto risco que entraram na primeira remissão devem ser considerados para a receção de um transplante de medula óssea (7). Por outro lado, os pacientes jovens sem características de risco apenas devem ser considerados para a receção do transplante se entrarem em relapso após o regime de quimioterapia indicado (7).

4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

O diagnóstico laboratorial de LLA passa pela demonstração de uma infiltração de pelo menos 20% de linfoblastos na medula óssea, através da avaliação morfológica de aspirado ou biópsia de medula óssea, imunofenotipagem por citometria de fluxo e avaliação das alterações citogenéticas (1). O estudo laboratorial inicial deve incluir o hemograma completo, esfregaço de sangue periférico, estudo de marcadores bioquímicos e estudos da coagulação sanguínea (1). Alguns pacientes devem ser avaliados em relação a possível infiltração do SNC (através da análise do Líquido Céfalo-Raquidiano (LCR)) e infeções (1). É também importante a tipagem HLA (*Human Leukocyte Antigen*) nos estudos laboratoriais iniciais (1).

4.1. Hemograma

Mais de 90% dos pacientes com LLA apresentam alterações em pelo menos um dos parâmetros

Tabela 1 – Fatores de bom e mau prognóstico na Leucemia Linfoblástica Aguda (2).

Fatores	Bom Prognóstico	Mau Prognóstico
Contagem de Leucócitos	Baixa	Alta
Sexo	Feminino	Masculino
Imunofenótipo	LLA-B	LLA-T (em crianças)
Faixa etária	Crianças	Adultos; Lactentes (< 2 anos)
Citogenética	Normal; Hiperploidia; rearranjo <i>TEL</i>	t(9;22); Rearranjos 11q23; Rearranjo do gene <i>MLL</i> ; Hipoploidia (< 44 cromossomas)
Tempo para eliminação dos blastos do sangue periférico	< 1 semana	> 1 semana
Tempo até remissão	< 4 semanas	> 4 semanas
Acometimento do SNC aquando do diagnóstico	Ausente	Presente
Doença residual mínima	Negativa em: 1 mês (crianças); 3 meses (adultos)	Positiva dos 3-6 meses

do hemograma aquando do diagnóstico (6). Estas alterações são devidas à infiltração da medula óssea pelos linfoblastos leucémicos (7). A alteração do hemograma mais frequente, presente em cerca de 80% dos pacientes, consiste na anemia normocítica normocrômica (6), acompanhada de reticulocitopenia (8).

Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam leucocitose (6), e cerca de 10-16% apresentam hiperleucocitose ($>100 \times 10^9/L$), indicativos de mau prognóstico (3). A neutropenia está também presente na maioria dos casos e 20-40% apresentam neutropenia profunda ($<0,5 \times 10^9/L$), tornando-os extremamente suscetíveis a infeções (3,6). Hiper eosinofilia, embora pouco frequente, pode preceder o diagnóstico por alguns meses (3). A maioria dos pacientes (90%) apresenta blastos leucémicos no sangue periférico, em porções bastante variáveis, existindo uma pequena parte dos pacientes que não os apresenta (leucemia “aleucémica”) (3,8).

A trombocitopenia é também um achado muito frequente, estando presente em 75% dos pacientes (6). As alterações mais frequentes encontram-se descritas na **Tabela 2**.

4.2. Esfregaço de Sangue Periférico

A observação do esfregaço de sangue periférico confirma os achados do hemograma, podendo ser encontrados blastos em número variável (2,7). Os blastos leucémicos variam desde células pequenas com alto rácio núcleo/citoplasma, com citoplasma escasso, a células maiores, mais heterogêneas com citoplasma mais abundante (8). Na presença de coagulação intravascular disseminada, podem ser observadas formas de esquizócitos (7).

4.3. Marcadores bioquímicos

Relativamente aos marcadores bioquímicos séricos são recomendados o estudo de lactato desidrogenase (LDH), ionograma, fósforo, cálcio, e perfis renal e hepático (6) (7). A LDH está aumentada na maioria

dos pacientes com LLA, encontrando-se correlacionada com a carga do infiltrado leucémico (3,6).

É comum a apresentação de hiperuricémia, decorrente de Síndrome de Lise Tumoral, em pacientes com grandes infiltrados leucémicos, refletindo a extensão da carga tumoral e a elevada taxa do catabolismo de purinas (3,6,9). Estes pacientes podem desenvolver falência renal, e apresentar hipercreatininémias, hiperurémias, hiperfosfatémias, e hipocalcémias (2,3,7). A hiperfosfatémia pode ser devida à leucopoiese ineficaz e/ou resultado da lise celular tumoral induzida pela quimioterapia, associadas à diminuição da excreção (6,9).

A hipercalcémia é um achado raro que resulta da libertação de proteínas paratormona-like a partir dos linfoblastos e/ou infiltração leucémica do osso (3,6). Em alguns casos ocorre também hipercaliémia devido à extensa lise celular tumoral (6).

Disfunção hepática, geralmente leve, verifica-se em cerca de 10-20% dos pacientes, mas não tem consequências significativas a nível clínico ou prognóstico (3,10). Apesar disto, é relativamente comum verificar-se um aumento das transaminases (alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)) aquando do diagnóstico, provavelmente associado a infiltração leucémica do fígado, podendo também estar associado a hepatites virais (11). O tratamento antineoplásico é também uma importante causa de lesão hepática, muitas das vezes permanente, que pode, da mesma forma, levar a um aumento dos marcadores hepáticos, pelo que estes devem ser estudados antes do início do tratamento e durante o mesmo (11).

Cerca de um terço dos pacientes pediátricos com LLA apresentam uma ligeira hipogamaglobulinémia, associada à diminuição do número de linfócitos, e à sua diminuição funcional (3).

4.4. Estudos de coagulação sanguínea

Cerca de 3 a 5% dos pacientes apresentam leves coagulopatias, principalmente na LLA-T, raramente

Tabela 2 – Achados típicos no hemograma de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (3,6,7).

Parâmetros	Hemoglobina	Leucócitos	Neutrófilos	Plaquetas	Blastos
Níveis	↓	↑	↓	↓	Presença

associadas a hemorragias clínicas (3). No entanto, um aumento do tempo de protrombina, diminuição dos níveis de fibrinogénio, e presença de produtos de degradação da fibrina, podem sugerir a presença de coagulação intravascular disseminada (7).

4.5. Aspirado e biópsia de medula óssea

O aspirado de medula óssea é o teste padrão definitivo para a confirmação do diagnóstico de leucemia (7). Em 10% dos pacientes com LLA não aparecem blastos em circulação na altura do diagnóstico (3) e os linfoblastos medulares estão presentes em maior número para estudos morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares (12). Em determinados casos, ocorre *dry tap* pela presença de fibrose ou alto nível de compactação blástica, devendo-se optar, nestes casos, pela colheita e análise de biópsia de medula óssea (13).

O diagnóstico de LLA requer a presença de pelo menos 20% de linfoblastos na medula óssea (segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde,

OMS – ver 4.8. *Análises citogenéticas e moleculares*) (14), embora 71-81% dos pacientes apresentem uma percentagem superior a 90% (3). Assim, é característica a observação de hiper celularidade medular, com infiltração dos espaços adiposos e hematopoiéticos normais por linfoblastos, como é possível observar na **Figura 1** (6,12).

Os linfoblastos leucémicos podem apresentar várias configurações morfológicas. Com base nestas configurações, foi proposta, em 1976, a primeira classificação aceite internacionalmente para leucemias agudas, a classificação *French-American-British* (FAB) (15). Esta divide a doença em 3 subtipos, descritos na **Tabela 3**. A classificação FAB foi substituída em 2008 pela classificação da OMS, que classifica os subtipos da patologia com base nas suas características morfológicas, imunológicas e citogenéticas (7).

Relativamente aos precursores mielóides e eritróides residuais na medula óssea, estes mantêm uma morfologia aparentemente normal (12).

Figura 1 – Biópsia de medula óssea de um paciente com Leucemia Linfoblástica Aguda (17).

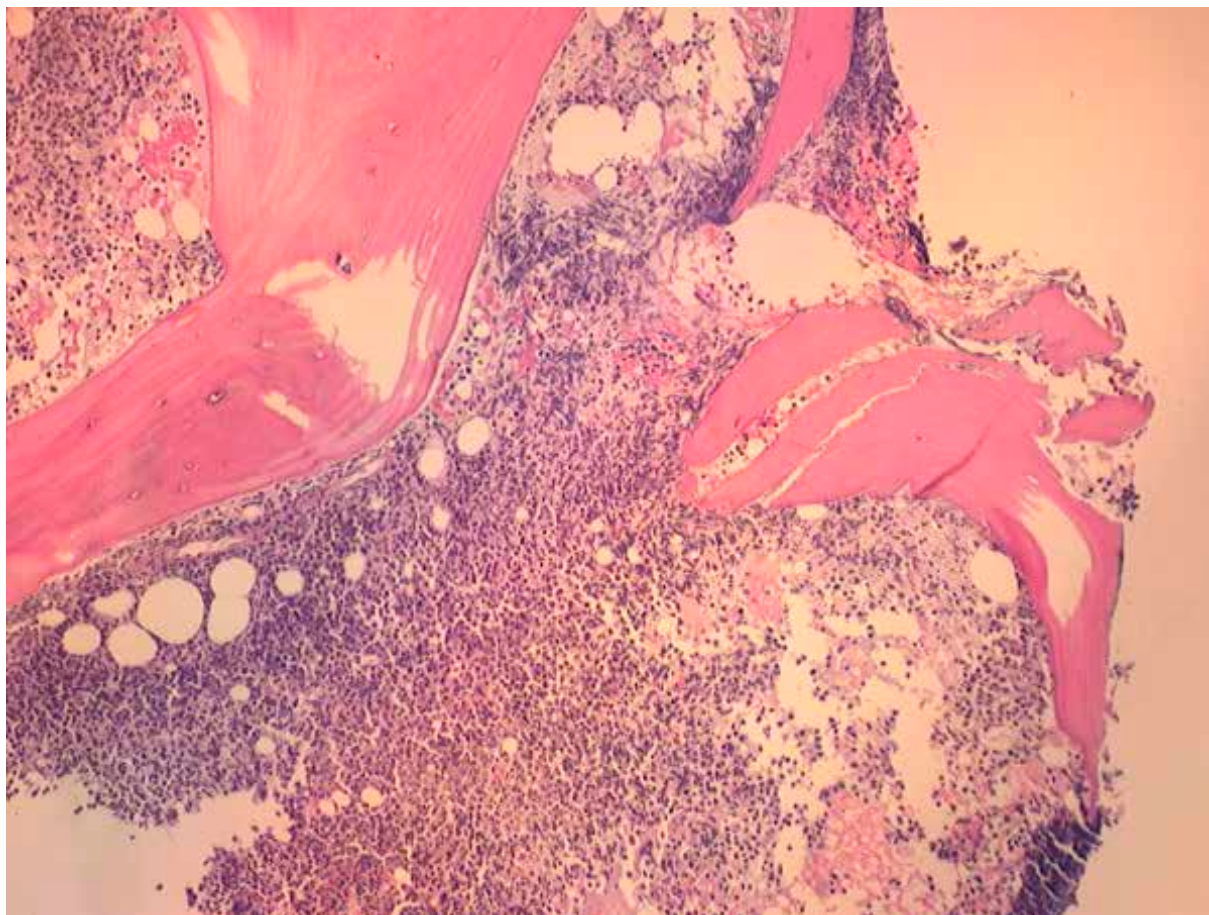


Tabela 3 – Classificação FAB da Leucemia Linfoblástica Aguda (7,8,15).

Subtipos	Aspeto morfológico
L1	Células pequenas, com alto rácio núcleo/citoplasma. Forma nuclear regular com cromatina homogénea, podendo apresentar fenda ou indentação, e com nucléolos pequenos ou ausentes. Citoplasma escasso.
L2	Células grandes, com baixo rácio núcleo/citoplasma, e heterogéneas. Forma nuclear irregular com cromatina heterogénea, podendo apresentar fenda ou indentação, e com nucléolos grandes e proeminentes. Citoplasma abundante.
L3	Células grandes e homogéneas. Forma nuclear regular, redonda ou oval. Nucléolos grandes e proeminentes. Citoplasma abundante basofílico, com vacuolização evidente.

Apesar da sua crucial importância, a análise morfológica de medula óssea corada com coloração de Wright ou Giemsa não permite a distinção entre LLA e Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (3,8), pelo que se torna essencial o estudo imunofenotípico por imunohistoquímica e/ou citometria de fluxo.

4.6. Colorações citoquímicas

Para além das colorações de Wright e Giemsa, caso não estejam disponíveis outros métodos (como imunofenotipagem por citometria de fluxo), os esfregaços de medula podem ser corados com colorações citoquímicas principalmente para distinção entre LLA e LMA (7).

As principais colorações utilizadas são as colorações de Mieloperoxidase (MPO), Sudão Negro B (SNB), Esterases Não-Específicas (ENE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Fosfatase Ácida (FA) e Transferase Desoxinucleotidil Terminal (TdT) (7). O resultado característico da citoquímica para LLA é a negatividade para MPO e SNB e positividade para TdT embora este seja negativo nos casos de LLA de células B maduras (7). Para além da distinção entre LLA e LMA, o marcador TdT, ao ser característico de células imaturas, também permite a distinção entre LLA e outras patologias malignas de linfócitos em fases mais avançadas de maturação, como linfomas (7). Em alguns pacientes, pode ser detetado um baixo nível de MPO devido à presença residual normal dos precursores mielóides (7).

A coloração com PAS é positiva, com grânulos grosseiros, em mais de 70% dos casos, e a colora-

ção com FA é positiva em cerca de 70% dos casos de LLA da linhagem T, corando o complexo de Golgi (2,3). A coloração para ENE geralmente é negativa para os linfoblastos leucémicos (3).

É importante notar que nenhuma das colorações reage exclusivamente com células linfóides leucémicas (3). Na **Tabela 4** estão representados os resultados citoquímicos característicos de LLA.

4.7. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As características morfológicas e citoquímicas dos linfoblastos leucémicos são pouco específicas para LLA (3). Assim, a imunofenotipagem por citometria de fluxo, que permite a determinação da presença de antigénios nas células leucémicas, é fundamental para o diagnóstico (1,3).

A distinção definitiva entre LLA e LMA passa pelo estudo dos marcadores imunofenotípicos: os pacientes com LLA apresentam marcadores linfóides, enquanto os pacientes com LMA apresentam marcadores mielóides (7). O diagnóstico de LLA confirma-se com a positividade dos marcadores linfóides típicos B (como CD19 e CD20) ou T (como cCD3 e CD7), e do marcador TdT, e a negatividade dos marcadores mielóides MPO e CD33, como representado na **Tabela 5** (7).

Mais especificamente, com base nos resultados desta técnica, a LLA pode ser dividida em quatro subtipos distintos: LLA de células B precursoras, que inclui LLA pró-B, LLA comum (cLLA; o subtipo de LLA mais frequente, tanto em crianças como adultos), e

Tabela 4 – Resultados citoquímicos característicos de Leucemia Linfoblástica Aguda (2,3,7).

Colorações	MPO	SNB	ENE	PAS	FA	TdT
Resultado	-	-	-	+	+ (LLA-T)	+ (LLA L1 e L2)

Tabela 5 – Imunofenotipagem típica da Leucemia Linfoblástica Aguda (7).

Marcador	TdT	CD19	CD20	CD79a	cCD3	CD7	MPO	CD33
Expressão	+	+ (LLA-B)	+ (LLA-B)	+ (LLA-B)	+ (LLA-T)	+ (LLA-T)	-	-

LLA pré-B; LLA de células B maduras; LLA de células T precursoras; e LLA de células T maduras (7). Estes subtipos estão associados a diferentes prognósticos, características clínicas e laboratoriais. No entanto, a nível de tratamento, é apenas importante a distinção entre LLA de células B precursoras, LLA de células B maduras e LLA de células T (3). A imunofenotipagem característica dos vários subtipos imunológicos de LLA encontra-se na **Tabela 6**.

4.8. Análises citogenéticas e moleculares

Cerca de 70% dos casos de LLA estão associados a alterações citogenéticas, detetadas por citogenética convencional ou técnica de FISH (*Fluorescence In Situ*

Hybridization), incluindo translocações e alterações no número de cromossomas (hiper e hipoploidias) (7). Na **Tabela 7** estão representadas as principais alterações genéticas na LLA infantil e LLA do adulto.

De acordo com estas alterações genéticas, assim como as características morfológicas e imunológicas, foi criada a classificação da OMS, representada na **Tabela 8** (15). Esta classificação elimina a LLA de células B maduras da categoria das Leucemias/Linfomas Linfoblásticos, incluindo-a noutra categoria (Neoplasmas de células B maduras) (2).

Os subtipos são importantes para avaliação prognóstica e estratificação de risco e escolha do melhor protocolo de tratamento (2,7).

Tabela 6 – Imunofenotipagem típica dos vários subtipos Leucemia Linfoblástica Aguda (1,3,7).

Subtipo	Classificação FAB	TdT	CD19/ cCD22/ cCD79a	CD10	cCD3/ CD7	CD1a/ CD2/ CD5
LLA pró-B	L1, L2	+	+	-	-	-
cLLA B	L1, L2	+	+	+	-	-
LLA pré-B	L1	+	+	+	-	-
LLA de células B maduras	L3	-	+	+ ou -	-	-
LLA de células T precursoras	L1, L2	+	-	-	+	+ ou -
LLA de células T maduras	L1, L2	+	-	-	+	+ ou -

Tabela 7 – Principais alterações citogenéticas, respetivos genes, e frequências em Leucemia Linfoblástica Aguda infantil e Leucemia Linfoblástica Aguda de adultos (1).

Citogenética	Gene associado	Frequência na LLA infantil (%)	Frequência na LLA do adulto (%)
Hiperploidia	-	25	7
Hipoploidia	-	1	2
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL1	3	25
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	22	2
T (variável; 11q23), por exemplo: (4;11), t(9;11), t(11;19)	MLL	8	10
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	5	3
t(5;14)(q31;q32)	IL3-IGH	<1	<1
t(8;14), t(2;8), t(8;22)	c-MYC	2	4
t(1;14)(p32;q11)	TAL-1	7	12
t(10;14)(q24;q11)	HOX11	1	8
t(5;14)(q35;q32)	HOX11L2	3	1

Para além dos estudos citogenéticos, estudos de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) podem ajudar na distinção dos pacientes com LLA t(9;22) (Cromossoma de Filadélfia, característico de Leucemia Mieloide Crónica, LMC) e LMC em fase blástica, pois a maioria dos pacientes com LLA apresentam o tipo p190 de bcr-abl, enquanto que os pacientes com LMC apresentam o tipo p210 de bcr-abl (7).

4.9. Análise do líquido céfalo-raquidiano

A análise do líquido céfalo-raquidiano (LCR) permite determinar o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) (3). A LLA do SNC é definida pela presença de, pelo menos, 5 leucócitos por microlitro de LCR ou pela presença de paralisias dos nervos cranianos (3). Cerca de um terço dos pacientes pediátricos apresentam blastos leucémicos no LCR aquando do diagnóstico sem que a maioria demonstre quaisquer sintomas neurológicos (3). Contudo, devido à possibilidade de transferência de células leucémicas para o SNC, a punção deve apenas ser realizada a um *timing* apropriado de acordo com o protocolo de tratamento, ou seja, caso seja necessário realizar este procedimento diagnóstico deve ser realizado concomitantemente com quimioterapia intratecal (1).

4.10. Análises microbiológicas

É recomendada a execução de análises microbiológicas (nomeadamente culturas de produtos biológicos, principalmente hemoculturas) em pacientes febris ou com sintomatologias de infeções oportunistas (mesmo que afebris) (1,7).

4.11. Tipagem *Human Leukocyte Antigen*

É recomendada a tipagem HLA nos estudos iniciais de todos os pacientes, exceto os que apresentem grandes contra-indicações ao transplante de medula óssea.

Em pacientes de alto risco sem irmãos possíveis dadores, deve ser considerada a avaliação inicial e procura de dadores alternativos (1).

4.12. Resumo do diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda

A **Tabela 9** apresenta os achados típicos dos principais testes laboratoriais realizados aquando do diagnóstico de LLA.

5. CONCLUSÃO

O diagnóstico da LLA depende essencialmente da avaliação morfológica da medula óssea, imuno-fenotipagem por citometria de fluxo e avaliação de alterações citogenéticas

O estudo laboratorial inicial deve incluir o hemograma, esfregaço de sangue periférico, estudo de marcadores bioquímicos e estudos da coagulação sanguínea.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a Muhammad N. Siddique, Muhammad Popalzai, Nelly Aoun, Rabih Maroun, Michael Awasum, e Qun Dai, autores do artigo "Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia presenting as obstructive jaundice: a case report" publicado pelo Journal of Medical Case Reports, assim como à editora do mesmo, BioMed Central, pela permissão de utilização de imagem.

Tabela 8 – Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda segundo a OMS (14).

Leucemia/Linfoma Linfoblástica B
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B, NES (não especificada)
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com t(9;22) (q34;q11.2), <i>BCR-ABL 1</i>
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com t(v; 11q23), rearranjo <i>MLL</i>
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com t(12;21) (p13;q22), <i>TEL-AML 1 (ETV6-RUNX1)</i>
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com hiperploidia
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com hipoploidia
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com t(5;14) (q31;q32), <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/Linfoma Linfoblástica B com t(1;19) (q23;p13.3) <i>TCF3-PBX1</i>
Leucemia/Linfoma Linfoblástica T

Tabela 9 – Principais características laboratoriais da Leucemia Linfoblástica Aguda (1,3,7).

Testes Laboratoriais		LLA	
Hemograma	Hemoglobina	↓	
	Leucócitos	↑	
	Neutrófilos	↓	
	Plaquetas	↓	
	Blastos	Presença	
Colorações citoquímicas	MPO	-	
	SNB	-	
	ENE	-	
	PAS	+	
	FA	+ (LLA-T)	
	TdT	+ (L1 e L2)	
Imunofenotipagem	Subtipos	LLA-B	LLA-T
	TdT	+ (L1 e L2)	+
	CD19, cCD22, cCD79a	+	-
	CD10	+ ou -	-
	cCD3, CD7	-	+
	CD1a, CD2, CD5	-	+ ou -
Citogenética	Alteração mais frequente	Crianças: Hiperplóidia Adultos: t(9;22)	

REFERÊNCIAS

- National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. 2013 [citado 2015 Jan 20]. Disponível em: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf
- Hoffbrand V, Moss P. Essential Haematology. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011.
- Lichtman M, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps T. Williams Hematology. New York: McGraw Hill Medical; 2005.
- Cancer Research UK. Acute lymphoblastic leukaemia risks and causes [Internet]. 2014 [citado 2015 Jan 05]. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/type/all/about/acute-lymphoblastic-leukaemia-risks-and-causes>
- Orphanet. Acute lymphoblastic leukemia [Internet]. 2007 [citado 2015 Jan 15]. Disponível em: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3732&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=leukemia&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group of diseases=Acute-lymphoblastic-leukemia&title=Acute-lymphoblastic-leukemia](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3732&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=leukemia&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group of diseases=Acute-lymphoblastic-leukemia&title=Acute-lymphoblastic-leukemia)
- British Medical Journal Publishing Group Limited. Acute lymphocytic leukaemia [Internet]. [citado 2015 Jan 3]. Disponível em: <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/273/diagnosis/step-by-step.html>
- Seiter K. Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. 2014 [citado 2015 Jan 18]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/207631-overview>
- Faderl S, Kantarjian H. Leukemias: Principles and Practice of Therapy. Chichester: Wiley-Blackwell; 2010.
- Hochberg J, Cairo MS. Tumor Lysis Syndrome: Current Perspective. *Haematologica* 2008; 93(1):9-13.
- Murakami J, Shimizu Y. Hepatic manifestations in hematological disorders. *Int J Hepatol* 2013; 2013:484903.
- Segal I, Rassekh S, Bond M, Senger C, Schreiber R. Abnormal liver transaminases and conjugated hyperbilirubinemia at presentation of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55(3):434–9.
- Greer J, Arber D, Glader B, List A, Means R, Paraskevas F, et al. Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
- Hoffbrand V, Catovsky D, Tuddenham E, Green A. Postgraduate Haematology. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011.
- Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- Pui C-H. Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research. Totowa: Humana Press; 2002.
- American Society of Hematology. ASH Image Bank: ALL - Peripheral Smear - 1. (#00002678) [Internet]. 2004 [citado 2015 Jan 15]. Disponível em: imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=2678&AssetType=Asset
- Siddique MN, Popalzai M, Aoun N, Maroun R, Awasum M, Dai Q. Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia presenting as obstructive jaundice: a case report. *J Med Case Rep* 2011; 5:269.
- Pathology Outlines. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) - general [Internet]. 2013 [citado 2015 Jan 12]. Disponível em: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaALL.html>
- Universidad Autónoma de Zacatecas. Histología [Internet]. [citado 2015 Jan 13]. Disponível em: http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_20b/c20b_s27.htm
- American Society of Hematology. ASH Image Bank: Cerebrospinal Fluid Analysis in ALL - 1. (#00002368) [Internet]. 2004 [citado 2015 Jan 17]. Disponível em: imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=2368&AssetType=Asset

Diagnóstico Laboratorial de Tricoleucemia

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA^{1*}

¹ Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

² Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

RESUMO

A Tricoleucemia é uma doença linfoproliferativa de linfócitos B, cujas células são caracterizadas por apresentarem projeções citoplasmáticas semelhantes a cabelos. Este trabalho apresentou como principais objetivos descrever as características epidemiológicas e clínicas, os fatores de valor prognóstico, os sistemas de estadiamento, e os esquemas de tratamento da Tricoleucemia, assim como caracterizá-la segundo o seu diagnóstico laboratorial. O seu diagnóstico depende da observação do esfregaço de sangue periférico e dos resultados da análise da biópsia de medula óssea e de testes de imunofenotipagem por imunohistoquímica e citometria de fluxo. Conclui-se assim que o estudo laboratorial é crucial para o diagnóstico da Tricoleucemia. Adicionalmente, o futuro dos testes laboratoriais para diagnóstico e estudo desta patologia passará pela realização de análises genéticas e moleculares, nomeadamente a sequenciação do exoma.

Palavras-chave: Tricoleucemia • Diagnóstico Laboratorial

Aceite para publicação a 08 de Abril de 2015

ABSTRACT

Hairy cell leukemia is a B-cell lymphoid neoplasm which cells are characterized for its hairlike cytoplasmic projections. The main objectives of this

paper were to describe the epidemiological and clinical characteristics, prognostic factors, staging systems, and treatment regimens of Hairy cell leukemia, as well as to characterize it according to its laboratory diagnosis. Its diagnosis depends on the observation of the peripheral blood smear and the results of the bone marrow biopsy analysis and immunohistochemistry and flow cytometry immunophenotyping. Therefore, we concluded that the laboratory studies are crucial for the diagnosis of Hairy cell leukemia. Furthermore, the future of laboratory tests for the diagnosis and study of this disease will depend on genetic and molecular analyzes, including exoma sequencing.

Keywords: Hairy Cell Leukemia • Laboratory Diagnosis

Accepted for publication: 8th April 2015.

1. INTRODUÇÃO

A Tricoleucemia (TL), também denominada por Leucemia de Células Cabeludas, é uma doença linfoproliferativa indolente de células B (1). As células leucémicas desta patologia são caracterizadas por apresentarem projeções citoplasmáticas semelhantes a cabelos (**Figura 1**), pelo que são conhecidas por “células cabeludas” (CC), e infiltram a medula óssea (envolvendo o sangue periférico) e a polpa vermelha do baço (1,2).

A etiologia da TL é desconhecida (1). Porém, alguns autores sugeriram fatores como a exposição anterior a radiação, químicos orgânicos, e historial de infeção por Vírus Epstein Barr como possíveis

* Correspondência:

Marisa Barbeira, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Avenida do Empresário, Campus da Talagueira, 6000-767 Castelo Branco, Portugal, Tel.: +351 272 340 560, E-mail: marisabarbeira@ipcb.pt

agentes etiológicos; no entanto, ainda não existem estudos que comprovem estas associações (2,3).

2. METODOLOGIA

Efetuiu-se uma revisão bibliográfica, pretendendo estudar as suas características epidemiológicas e clínicas, fatores de valor prognóstico, sistemas de estadiamento, e esquemas de tratamento, bem como as principais metodologias de diagnóstico e estudo laboratorial da TL. Esta revisão teve como base livros de referência na área de hematologia, assim como artigos atuais de investigação e revisão, em diversas áreas científicas, incluindo *guidelines* para o diagnóstico e tratamento da TL e, por último, *websites* relevantes na área da medicina.

3. TRICOLEUCEMIA

3.1. Epidemiologia

A TL é uma patologia relativamente incomum, representando cerca de 2% de todas as leucemias a nível mundial (4), e apresentando 1600 novos casos por ano na Europa (5). A patologia predomina em indivíduos do sexo masculino (rácio de 4-5:1) de meia-idade, com uma idade média ao diagnóstico de 50 anos (4).

3.2. Características clínicas

Como referido, as CC infiltram predominantemente a medula óssea e o baço (1). Assim, as manifestações mais comuns aquando do diagnóstico consistem em astenia, fadiga, febre, infeções, e hemorragias, relacionadas com as citopenias decorrentes da infiltração medular, e esplenomegália e dor no quadrante superior esquerdo, relacionadas com a infiltração esplénica (1). Menos frequentemente, os pacientes apresentam hepatomegália (4) e, dado que as CC raramente infiltram os nódulos linfáticos, apenas 10% apresentam adenomegalias (4).

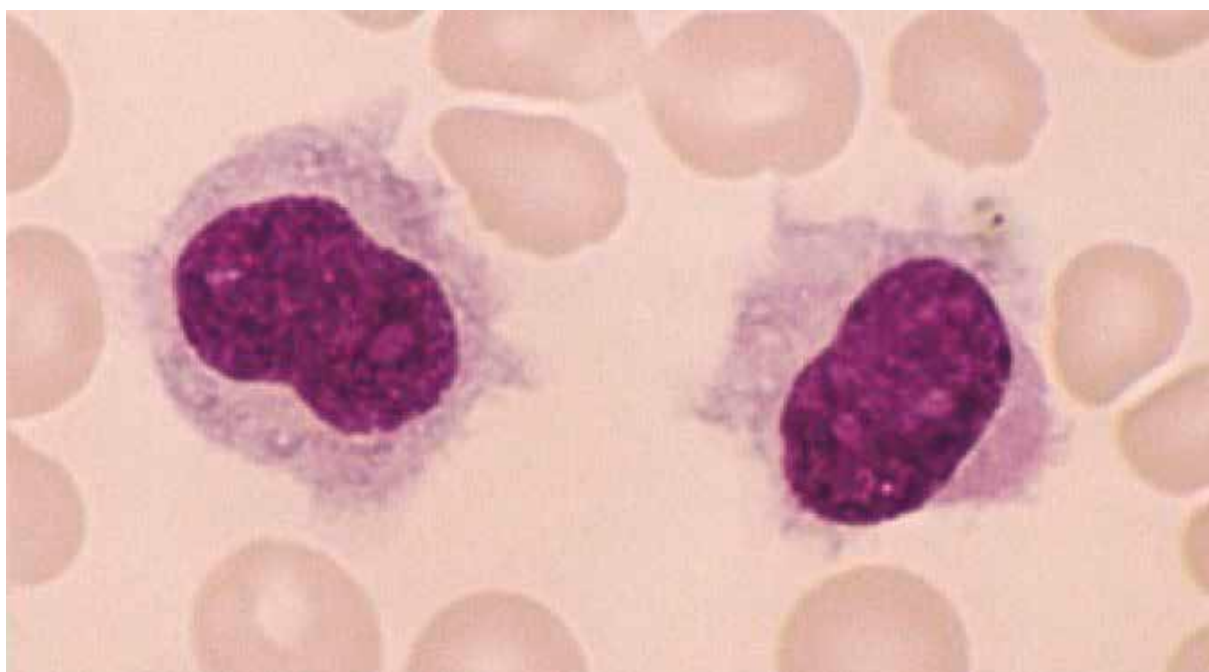
3.3. Fatores com valor prognóstico

Os principais fatores que afetam o prognóstico da TL são a idade avançada, a presença de citopenias em qualquer combinação, linfadenopatias abdominais aquando do diagnóstico, resposta aos análogos de purinas, e resposta a esplenectomia (apenas quando necessário efetua-la) (4,6).

3.4. Tratamento

A maioria dos pacientes (90%) necessita de tratamento aquando do diagnóstico ou durante o curso da doença, nomeadamente na presença de citopenias e decorrentes anemias, infeções e/ou hemorragias, e na presença de esplenomegália sintomática (2,4).

Figura 1 – Células Cabeludas características de Tricoleucemia (8)



Os pacientes que não apresentem estas manifestações podem ser apenas monitorizados periodicamente, sem necessidade de tratamento (4). Para os pacientes que necessitam de tratamento, os agentes terapêuticos de primeira linha são os análogos de purinas, principalmente a Cladribina e a Pentostatina (4). O uso de fatores de crescimento, como o Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos (G-CSF) não é recomendado, devendo apenas ser administrado em casos de neutropenia severa (4). É indicada a esplenectomia aos pacientes com esplenomegália significativa, principalmente quando o envolvimento da medula óssea é mínimo (4).

4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TRICOLEUCEMIA

O diagnóstico laboratorial da TL depende essencialmente da análise de um esfregaço de sangue periférico e de uma biópsia de medula óssea (corada com as colorações de hematoxilina-eosina e reticulina) (4). A confirmação da natureza do infiltrado é executada através de imunohistoquímica (4). Sempre que possível, deve ser realizada a imunofenotipagem por citometria de fluxo (4). Embora ainda seja uma metodologia em investigação, aconselha-se o *screening* de uma mutação específica através de sequenciação do exoma a todos os doentes recém-diagnosticados (4).

4.1. Hemograma

O achado laboratorial característico aquando do diagnóstico da TL é a presença de citopenias bilineares ou, principalmente, trilineares (pancitopenia) (4). A anemia, geralmente normocítica normocrômica, está presente na maioria dos pacientes, com cerca de 70% a apresentarem um valor de hemoglobina inferior a 10 g/dL (3,4). A maioria dos pacientes apresenta, simultaneamente, leucopenia aquando do diagnóstico, sendo que cerca de 65% apresentam uma contagem de leucócitos inferior a $5 \times 10^9/L$ (4). Porém, alguns pacientes apresentam contagens

normais ou elevadas de leucócitos (como resultado das CC presentes no sangue periférico) (7). A neutropenia está presente em mais de 90% dos casos, sendo severa em cerca de 33% (7). Regra geral, não existem alterações significativas a nível dos eosinófilos e basófilos, mas a monocitopenia, presente em mais de 90% dos casos, é um achado característico de TL apresentando relevância no diagnóstico laboratorial (4). Cerca de 80% dos pacientes apresentam trombocitopenia, sendo que a sequestração esplénica poderá ser um fator importante nomeadamente em casos de esplenomegália maciça (4). Os achados típicos no hemograma de pacientes com TL encontram-se na **Tabela 1**.

4.2. Esfregaço de Sangue Periférico

As CC estão presentes no sangue periférico da grande maioria (95%) dos pacientes, embora em proporções bastante variáveis (4,7). Estas células, apresentadas na **Figura 1**, consistem em células linfóides pequenas a médias, aproximadamente com o dobro do tamanho de linfócitos normais, com um núcleo redondo, oval ou reniforme, com cromatina homogénea e nucléolos indistinguíveis (1,4,8). O citoplasma é abundante e azul pálido, com projeções semelhantes a cabelos (1,4).

4.3. Colorações citoquímicas

A única coloração citoquímica utilizada para o diagnóstico de TL é a Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) (1). As CC apresentam uma enzima, a fosfatase ácida isoenzima 5, que resiste à descoloração pelo tartarato (2). Assim, praticamente todos os pacientes apresentam pelo menos algumas células com uma forte positividade granular citoplasmática (1). Uma coloração fraca a moderada pode ocorrer noutras patologias pelo que não tem utilidade no diagnóstico (1,2). Esta coloração é cada vez menos utilizada, pela disponibilidade atual de anticorpos monoclonais anti-TRAP (4).

Tabela 1 – Achados típicos no hemograma de pacientes com Tricoleucemia (4,7).

Parâmetros	Hemoglobina	Leucócitos	Neutrófilos	Monócitos	Plaquetas
Níveis	↓	↓	↓	↓	↓

4.4. Marcadores bioquímicos

A TL não conduz a alterações a nível dos marcadores bioquímicos na maior parte dos casos (2). Porém, pode verificar-se a presença de azotémia (hiperurémia e hipercreatininémia) em 27% dos pacientes, e alterações nos marcadores de função hepática, nomeadamente alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), em 19% (2). A presença de hipogamaglobulinémia é rara, sendo mais frequente a presença de hipergamaglobulinémia (19% dos pacientes) (2). A TL, em fases avançadas, está também associada com a presença de hipocolesterolémia, associada a baixos níveis de *low-density lipoproteins* (LDL), que retorna aos níveis normais após tratamento bem-sucedido (2).

4.5. Aspirado e biópsia de medula óssea

A maioria dos casos de TL está associada a um aumento da fibrose reticulínica (4,7). Deste modo, não é possível aspirar com eficiência a medula óssea (*dry tap*) em cerca de 90% dos pacientes (4,7). Nos 10% dos pacientes em que é possível realizar a aspiração, pode observar-se a presença das CC, embora menos características do que no sangue periférico. Conjuntamente, consegue verificar-se no aspirado a diminuição profunda dos precursores de granulócitos e monócitos, e uma diminuição menos acentuada das séries eritróides e megacariocíticas

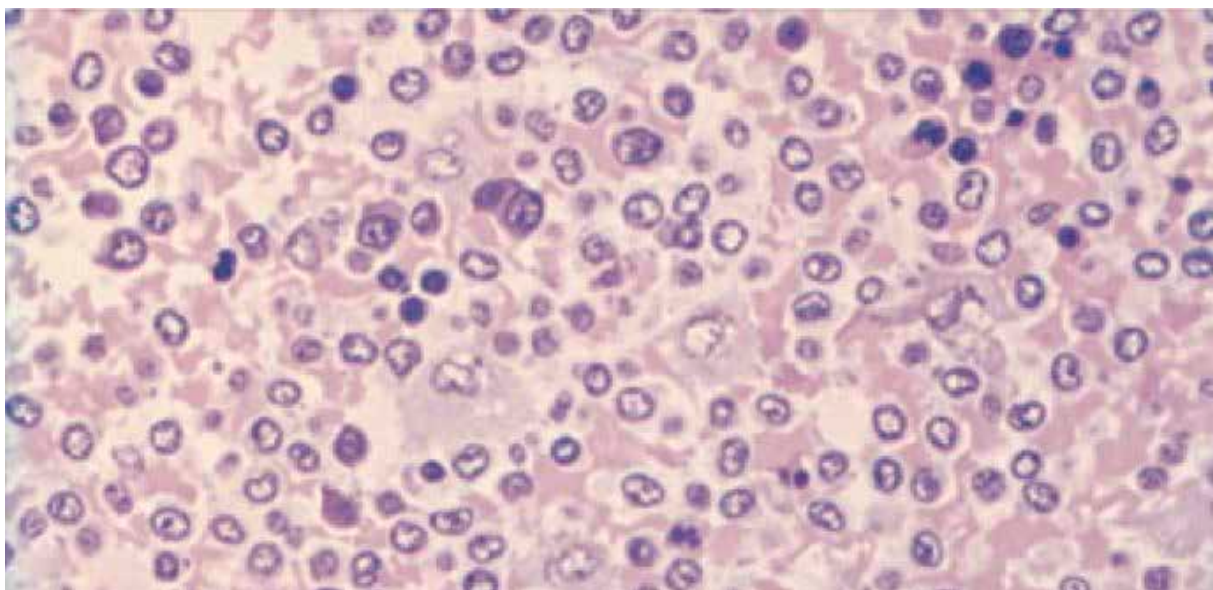
(7). Devido à elevada percentagem de *dry taps*, o diagnóstico é feito principalmente a partir da biópsia de medula óssea (1).

A biópsia, corada com coloração de hematoxilina-eosina, revela um grau de infiltração variável, e um padrão de infiltração (difuso ou focal) único (4). As células leucémicas não demonstram projeções citoplasmáticas evidentes, mas apresentam um pálido e abundante citoplasma (pelo que aparentam estar distanciadas), e um núcleo redondo, oval ou indentado, como é possível observar na **Figura 2**, pelo que o padrão é conhecido por padrão “ovo estrelado” (2,4). Uma pequena proporção de pacientes pode apresentar uma medula óssea hipocelular, levando ao diagnóstico erróneo de anemia aplásica (1). Outra das características típicas desta patologia é a presença de uma fibrose reticulínica difusa, raramente observada noutras doenças linfoproliferativas crónicas, pelo que poderá ser usada a coloração de reticulina para evidenciar as fibras (7).

4.6. Imunofenotipagem por imunohistoquímica

A confirmação da natureza das células infiltrantes da medula óssea é feita através da aplicação de técnicas de imunohistoquímica nas biópsias de medula óssea (4). Para a realização deste estudo não são utilizados os marcadores típicos de TL (como CD103) determinados

Figura 2 – Biópsia de medula óssea típica de Tricoleucemia (8).



através de imunofenotipagem por citometria de fluxo, pois alguns dos antígenos são destruídos pelos tratamentos histológicos convencionais (9). Utilizam-se os anticorpos anti-CD20, DBA.44 (anti-CD72), e anticorpo reativo contra TRAP que podem ser usados para corar secções processadas rotineiramente (2,4). A sensibilidade do uso dos marcadores TRAP/DBA.44 é de 100%, apresentando também alta especificidade (8). O marcador mais específico é a Anexina 1, pois não é expressa por mais nenhuma doença linfoproliferativa de células B (4,9). A **Figura 3** demonstra os resultados da imunofenotipagem por imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD20 (**3A**) e o anticorpo anti-CD72 (**3B**).

4.7. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A imunofenotipagem por citometria de fluxo, em amostras líquidas (sangue periférico ou aspirado de medula óssea), deve ser realizada sempre que possível (4). Devem ser estudados dois painéis de anticorpos monoclonais. Um deles é o painel das células B (CD19, CD20, CD22, e imunoglobulinas de superfície monoclonais) que é sempre positivo, pois as CC são células B maduras (2). O outro painel é o painel típico da TL (CD11c, CD25, CD103, CD123), em que, a positividade para 3 ou 4 dos marcadores permite a distinção entre a TL e outras

doenças linfoproliferativas B (4). Para além destes marcadores, a TL também apresenta positividade para o marcador FMC7, e negatividade para CD5 (presente, por exemplo, na LLC), CD10 (presente, por exemplo, no LF), e CD23 (4). Os resultados típicos da imunofenotipagem de TL encontram-se descritos na **Tabela 2**.

4.8. Sequenciação do exoma

Recentemente foi detetada, através de sequenciação do exoma, a presença da mutação *BRAF* V600E em 100% dos 47 casos de TL estudados (4). Embora estes dados ainda não tenham sido validados, recomenda-se o *screening* desta mutação em pacientes recém-diagnosticados, pois esta poderá ter implicações a vários níveis, nomeadamente diagnóstico e terapêutico (4).

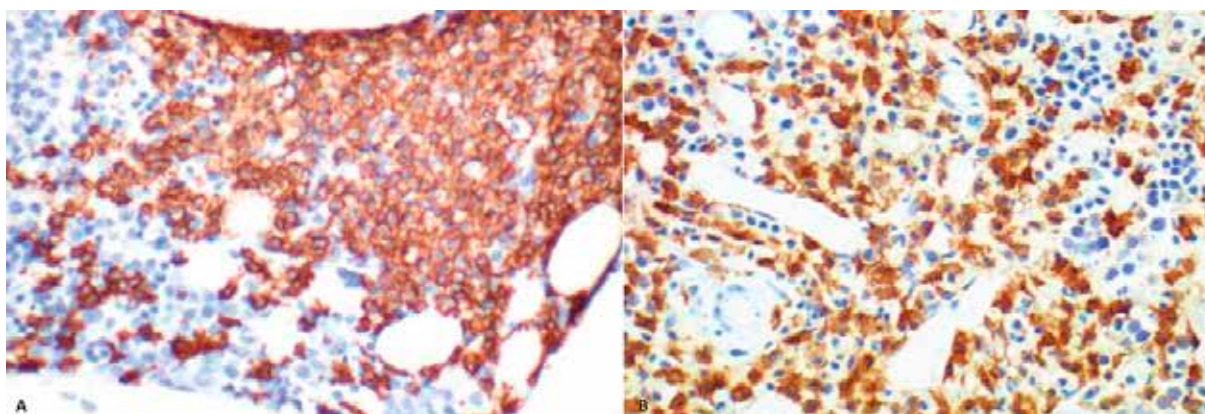
5. CONCLUSÃO

O diagnóstico da TL depende da observação do esfregaço de sangue periférico, dos resultados da análise da biópsia de medula óssea e de testes de imunofenotipagem por imunohistoquímica e citometria de fluxo. O futuro dos testes laboratoriais para diagnóstico e estudo da TL passará pela realização de análises genéticas e moleculares, nomeadamente a sequenciação do exoma.

Tabela 2 – Imunofenotipagem típica de Tricoleucemia (4). [slg: Imunoglobulinas de superfície; CD: *Cluster of Differentiation*].

Marcador	slg	CD19	CD20	CD22	CD11c	CD25	CD103	CD123	FMC7	CD5	CD10
Expressão	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Figura 3 – Imunohistoquímica em biópsia de medula óssea de paciente com Tricoleucemia. Marcador anti-CD 20 (positivo) (**3A**). Marcador anti-CD72 (positivo) (**3B**) (9).



AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a A. Hoffbrand e P. Moss, autores do livro “Essential Haematology”, assim como a K. Gatter, G. Delson, R. Warnke, F. Pezzella, autores

do livro “The Diagnosis of Lymphoproliferative Diseases”, e também à editora de ambos os livros, Wiley-Blackwell, pela permissão de utilização de imagens.

REFERÊNCIAS

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H et al. WHO Classification of Tumour of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. Lichtman M, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps T. Williams Hematology. Nova Iorque: McGraw Hill Medical; 2005.
3. Besa E. Hairy Cell Leukemia Workup [Internet]. 2014 [Atualizado em 2014 Jan 23; Citado em 2014 Nov 10], Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/200580-workup>.
4. Jones G, Parry-Jones N, Wilkins B, Else M, Catovsky D. Revised guidelines for the diagnosis and management of hairy cell leukaemia and hairy cell leukaemia variant. Br J Haematol 2011; 156:186–95.
5. Basheer F, Bloxham D, Scott M, Follows G. Hairy cell leukemia – immunotargets and therapies. *Immunotargets Ther* 2014; 3:107–20.
6. Chandran R, Gardiner S, Smith S, Spurgeon S. Improved survival in hairy cell leukaemia over three decades: a SEER database analysis of prognostic factors. Br J Haematol 2013; 163:404–20.
7. Allsup D, Cawley J. The diagnosis and treatment of hairy-cell leukaemia. Blood Rev 2002; 16:255–62.
8. Hoffbrand A, Moss P. Essential Haematology. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011.
9. Gatter K, Delson G, Warnke R, Pezzella F. The Diagnosis of Lymphoproliferative Diseases. Oxford: Wiley-Blackwell; 2012.



RECONHECIMENTO ACKNOWLEDGEMENT

**A Revista Bioanálise agradece e reconhece
o contributo dos colegas Revisores
para a melhoria dos artigos publicados.**

Mónica Alves
José Eduardo
Francisco Freitas
António Aleixo
Francisco Rodrigues





Resumos das Comunicações

M E N S A G E M D O P R E S I D E N T E

E agora algo que ninguém lê...

Atualmente há duas grandes questões que devemos refletir como profissionais de Análises Clínicas e Saúde Pública (ACSP). Uma é a revisão e requalificação da carreira no sentido, mais que justo, de carreira superior. A outra é a fusão que está em curso das licenciaturas em ACSP e Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica (APCT) no curso de Ciências Biomédicas Laboratoriais.

A Carreira de Técnicos Superiores de Saúde

À data que vos escrevo esta mensagem, ainda não se realizou a reunião entre os dois Sindicatos e os representantes do Governo, que terá como ponto forte a revisão e requalificação da nossa carreira como Técnicos Superiores de Saúde.

Praticamente desde que entramos neste milénio, para ser mais dramático, que a nossa atual, e há muito tempo “congelada”, carreira de Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica (TDT) se encontra desatualizada face ao grau académico dos cursos, assim como à elevada complexidade e especificidade funcional destes profissionais na prestação de cuidados de saúde. Já agora adiciono o argumento da equidade (mas a verdadeira) entre as diferentes carreiras superiores.

Estes argumentos são tidos como verdadeiros por todos, o que torna ainda mais incompreensível e insuportável o arrastar das negociações ao longo dos anos e abrangendo vários governos.

Um sentimento de injustiça tomou os TDT, de tal forma que se viu uma mobilização e organização massiva dos profissionais para a recente greve a tempo indeterminado, mas que foi suspensa após marcação de renegociações com o Governo.

Relativamente às causas deste impasse nas negociações as opiniões dividem-se. Os interesses corporativos de outras classes profissionais e a visão puramente economicista dos Governos e demais empregadores, estão no topo da lista. Mas não serão as únicas para justificar estarmos ainda na “estaca zero”.

A condimentar as causas principais para o atraso negocial não será alheia a génese política que está por trás dos Sindicatos e respetivas centrais sindicais, que os coloca em lados opostos e em constante atrito, com resultados óbvios. Este triângulo negocial, composto pelo Governo e os dois Sindicatos representantes dos TDT, está-se a revelar um “Triângulo das Bermudas” de onde nada sai há anos e que, se acreditarmos em tudo o que se lê nos comunicados dos Sindicatos e redes sociais, está cheio de “Cavaleiros oportunistas, comedores de lentilhas, traidores e manipuladores de várias cores”...

Tudo isto não traz muito otimismo aos TDT, que preferem uma discussão e negociação forte e inteligente, por quem nos representa, centrada numa proposta de carreira íntegra, justa e digna.

Relativamente a este assunto deixo uma pergunta: Quem de vós já teve acesso e leu as propostas de carreira dos Sindicatos?... Podíamos começar por aí!

Novo curso de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Este novo curso, resultante da fusão das licenciaturas de ACSP e APCT, é certamente uma das alterações mais importantes na nossa profissão e que moldará o futuro da nossa carreira. Apesar da sua extrema importância para o futuro, foi um processo que apanhou muitos de surpresa.

Este processo é imparável; no entanto, colocam-se muitas questões que afetam tanto estudantes como profissionais e necessitam ser esclarecidas. Para isso nada melhor que reunir profissionais e docentes de ambos os cursos e, numa mesa redonda, discutir e esclarecer todas as questões, abrindo a discussão a todos os que nos ouvem. Esta oportunidade concretiza-se no XII Congresso da SPBS no Porto, ao qual presido e onde espero que todas as questões sejam abordadas e os participantes esclarecidos.



Moisés de Brito Correia Vaz
(Presidente da Direção da SPBS)

XII CONGRESSO DE ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE BIOANALISTAS CLÍNICOS

Auditório Universidade Fernando Pessoa – Porto

PROGRAMA CIENTÍFICO

SÁBADO, 18 DE ABRIL DE 2015

- 08.45h – **Abertura do Secretariado**
Receção dos Posteriores ao Congresso
- 09.00h – **Comunicações Livres**
Moderador: José Machado^{1,2} e Raquel Rodrigues²
¹Dir. Científico Adj. da Revista Bioanálise; ²SPBS / C. Hospit. Tondela-Viseu, EPE
- 10.15h – Intervalo
- 10.30h – **Painel: Microbiologia Clínica**
Moderadora: Maria Angelina Lameirão Santos
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho EPE
- Estado da Arte no Diagnóstico de Tuberculose**
Rosário Braga
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho EPE
- Epidemiologia Molecular da Tuberculose**
Anabela Medo Miranda
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Porto
- Biologia Molecular no Diagnóstico Microbiológico em Contexto de Urgência**
Vânia Soares
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho EPE
- Diagnóstico Laboratorial de Infecções por Fungos Filamentosos - Implementação e experiência de um ano.**
Gabriela Abreu
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho EPE
- Avanços em Microbiologia Clínica: Diagnóstico Laboratorial de Infecções Anaeróbias em Portugal – Projeto de Investigação**
Bruno Costa
Universidade de Santiago de Compostela
- 12.30h – Almoço Livre
- 14.00h – **Painel: Novidades em Citometria**
Moderador: Alexandre Salvador
Enzifarma
- Imunodeficiências Primárias - qual o papel da Citometria de Fluxo?**
Catarina Martins
NOVA Medical School / Faculdade de Ciências Médicas Universidade Nova de Lisboa
- Células Th17 em Autoimunidade**
Artur Paiva
Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra - Área da Transpl. | IPST, IP
- 15.00h – **Tempo de Geração de Trombina, na Presença de Trombomodulina, para avaliação do risco de trombose em doentes com défice na via da proteína C**
Ana Cristina Oliveira
Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE
- 15.30h – **Fármacos no Ambiente: estará o ambiente sobremedicado?**
Lúcia Santos
REQUIMTE/LAQV/Instituto Superior de Engenharia do Porto
- 16.00h – Intervalo
- 16.15h – **Painel: A Atualidade do Laboratório de Imunohematologia**
Moderadora: Inês Pinto
SPBS / SSMT, Centro Hospitalar Tondela-Viseu, EPE
- A Rotina no Laboratório de Imunohematologia**
Ana Palmira Amaral
SSMT, Centro Hospitalar Tondela-Viseu, EPE.
- Casos clínicos: Discrepância ABO; Doença Hemolítica do recém nascido; Transfusão no recém nascido; Anemia Hemolítica Autoimune: como transfundir.**
Ana Palmira Amaral; Carmen Faria
SSMT, Centro Hospitalar Tondela-Viseu, EPE; Centro Hosp. e Univers. de Coimbra, EPE
- 17.15h – **Mesa Redonda: Ciências Biomédicas Laboratoriais - A Nova Realidade Face à Agregação dos Cursos de Análises Clínicas e Saúde Pública e da Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica**
Moderador: Moisés Vaz (Presidente da Direcção da SPBS)
- Maria Manuela Amorim
Coordenadora da Licenciatura em Análises Clínicas e de Saúde Pública (ESTSP)
- Marisa Barbeira
Sub-coordenadora da Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública (ESALD)
- Cândido Teixeira
Investigador e dirigente associativo na área das ciências e tecnologias da saúde
- Amadeu Borges Ferro
Ex-Diretor de Curso da Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica (ESTE SL)
- 18.15h – **Entrega de Prémios – Melhor Poster e Comunicação Livre**
José Machado (Vice-Presidente da Direcção da SPBS)
- 18.20h – **Sessão Solene de Encerramento do Congresso**
Presidida por: Teobaldo Simões (Presidente do Cons. Fiscal da SPBS)
Moisés Vaz (Presidente da Direcção da SPBS)
Cândido Teixeira (Presid. da Mesa da A. Geral da SPBS)
- 18.30h – **Entrega de Certificados**
- 19.00h – **Encerramento do Secretariado**

PRESIDENTE DO CONGRESSO

Moisés de Brito Correia Vaz

VICE-PRESIDENTE DO CONGRESSO

José Machado

COMISSÃO CIENTÍFICA

Mestre Francisco Freitas	Dr.ª Fátima Alexandra Silva
Mestre Joaquim Cunha	Dr. Francisco Soares
Mestre José Eduardo	Dr.ª Helena Lirio
Mestre Raquel Rodrigues	Dr.ª Inês Pinto
Mestre Sílvia Pires	Dr.ª Luísa Frias
Mestre Susana Santos	Dr.ª Maria José Pires
Mestre Teobaldo Simões	Dr.ª Maria José Reis
Dr. Cândido Teixeira	Dr. Moisés Vaz



XII CONGRESSO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

CONFERÊNCIAS

Estado da Arte no Diagnóstico da Tuberculose	33
ROSÁRIO BRAGA Serviço de Patologia Clínica – Centro Hospitalar de Vila Nova Gaia/Espinho EPE	
Epidemiologia molecular da tuberculose	33
ANABELA MIRANDA Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge	
Biologia Molecular no Diagnóstico Microbiológico em Contexto de Urgência.....	34
VÂNIA SOARES Serviço de Patologia Clínica, CHVN Gaia/Espinho, EPE	
Diagnóstico Laboratorial de Infecções por Fungos Filamentosos – Implementação e Experiência de 1 ano	34
GABRIELA ABREU Serviço de Patologia Clínica, CHVN Gaia/Espinho, EPE	
Avanços em Microbiologia Clínica: Diagnóstico Laboratorial de Infecções Anaeróbias em Portugal – Projeto de Investigação	35
BRUNO COSTA Universidade de Santiago de Compostela	
Imunodeficiências Primárias – qual o papel da Citometria de Fluxo?	36
CATARINA MARTINS NOVA Medical School / Faculdade de Ciências Médicas Universidade Nova de Lisboa	
Tempo de geração de trombina, na presença de trombomodulina, para avaliação do risco de trombose em doentes com défice na via da proteína C	37
A. CRISTINA OLIVEIRA, T. FIDALGO, P. MARTINHO, C. SILVA PINTO, E. GONÇALVES, D. MARQUES, T. SEVIVAS, R. SALVADO E M. L. RIBEIRO Serviço de Hematologia CHC, Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, E.P.E., Portugal	
Fármacos no ambiente: estará o ambiente sobremedicado?	39
LÚCIA H.M.L.M. SANTOS REQUIMTE /LAQV/ Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto	
A actualidade no Laboratório de Imuno-hematologia	40
ANA PALMIRA AMARAL SSMT, CHTV, EPE	
Ciências Biomédicas Laboratoriais	41
MARISA BARBEIRA Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Castelo Branco	

CONFERÊNCIAS

Estado da arte no Diagnóstico da tuberculose

ROSÁRIO BRAGA

Serviço de Patologia Clínica

Centro Hospitalar de Vila Nova Gaia/Espinho EPE

Portugal diminui em muito a sua incidência 21,8/100.000 habitantes (Março 2014) continua a ser o único país de incidência intermédia na Europa Ocidental. Nalguns países europeus com menos 100 casos de TB por **milhão** de habitantes a OMS em conjunto com European Respiratory Society (ERS) apresentou um programa **Eliminação da TB**. Os conhecimentos informáticos, quânticos e genéticos permitiram desenvolver tecnologias aplicáveis ao laboratório capazes de detetar e identificar rapidamente por testes de amplificação, hibridização e ou restrição de ácidos nucleicos específicos, o *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), micobactérias não tuberculosas (MNT), resistências molecular aos antibióticos, despistando em 24 horas uma suspeita de multirresistência, documentar por genotipagem transmissão TB, reativação versus infeção recente e eventos de contaminação cruzada laboratorial, no entanto os métodos moleculares não substituem os exames culturais e os testes de suscetibilidade aos antibacilares, por último desenvolver reações imunológicas dirigidas à tuberculose infeção latente diminuindo a progressão para doença activa. O diagnóstico rápido e preciso, o tratamento adequado e o rastreio dos contactos são a base do controlo da doença.

Epidemiologia molecular da tuberculose

ANABELA MIRANDA

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

A compreensão da transmissão da tuberculose na comunidade permite o desenho correto

de estratégias de prevenção. A epidemiologia clássica com base na investigação de contactos que visa identificar as ligações entre pacientes com tuberculose não é totalmente bem sucedida a descobrir os mecanismos de transmissão da doença. Por outro lado, a genotipagem de estirpes clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* constitui uma ferramenta poderosa para encontrar e identificar correntes de transmissão da tuberculose e surtos. Além disso, estudos de genotipagem da população do complexo *M. tuberculosis* têm desvendado uma estrutura clonal composta por linhagens filogenéticas distintas, com diferente distribuição geográfica, imunogenicidade, virulência e associação com a resistência aos fármacos, e as respectivas implicações a nível clínico e de saúde pública.

Nesta apresentação serão dados exemplos práticos da contribuição dos métodos de tipagem molecular para a compreensão do contexto epidemiológico da tuberculose em três situações diferentes:

- **Estudo de distribuição geográfica:** a tipagem por MIRU-VNTR foi usada para calcular a taxa de transmissão recente de tuberculose, identificar focos de transmissão e descrever a diversidade de uma população de *M. tuberculosis* na zona de Vila Nova de Gaia. Deste estudo concluiu-se que o método de tipagem MIRU-VNTR tem um bom poder discriminatório (HGI de 0,976) nesta área geográfica. As linhagens Lam e Haarlem correspondem a 80,9% das estirpes isoladas, o que está de acordo com a filogeografia do *M. tuberculosis* no Sul da Europa. E, finalmente, a importação de estirpes na região não é um problema.
- **Análise de surtos:** o objetivo do presente estudo foi demonstrar o valor decisivo da epidemiologia molecular na confirmação (ou não) de surtos de tuberculose identificados pelo rastreio de contactos convencional. Entre 2005 e 2009, três surtos de tuberculose foram investigados. Este trabalho demonstra a utilidade da epidemiologia molecular no que diz respeito ao estudo de surtos de tuberculose. Sem a genotipagem das

CONFERÊNCIAS

estirpes de *M. tuberculosis* uma adequada gestão dos surtos descritos neste trabalho não teria sido possível.

- **Caracterização da tuberculose multirresistente:** as estirpes multiresistentes disponíveis no Laboratório Nacional de Referência para Micobacterias do Porto foram genotipados usando o método MIRU-VNTR de acordo com o protocolo padronizado. A reprodutibilidade e exactidão do método de tipagem foram verificadas com amostras de referência fornecidos pelo RIVM, bem como com amostras de DNA do kit de validação GenoScreen. As informações fornecidas por genotipagem são fundamentais para a concepção e implementação das estratégias adequadas de controlo da tuberculose multirresistente.

Biologia Molecular no Diagnóstico Microbiológico em Contexto de Urgência

VÂNIA SOARES

Serviço de Patologia Clínica, CHVN Gaia/Espinho, EPE

O principal marco no desenvolvimento das técnicas de diagnóstico molecular foi a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR- *Polimerase Chain Reaction*), um método de clonagem in vitro proposto por Kary Mullis em 1987. Mais tarde, a possibilidade de monitorizar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA.

Durante a última década, as técnicas de biologia molecular tiveram uma evolução significativa, o exemplo disso é a inovação tecnológica da PCR em tempo real. Esta metodologia engloba numa única reação a extração, amplificação e deteção permitindo a obtenção de resultados mais rápidos, o ideal na rotina laboratorial em contexto de urgência, disponível 24 por dia.

No Centro Hospitalar de Vila nova de Gaia/ Espinho, EPE, a metodologia está recentemente implementada

no âmbito da prevenção e controlo da infeção associada ao MRSA e no diagnóstico na suspeita de infeção por *Clostridium difficile*, com o objectivo de reduzir o tempo médio de internamento e de custos para o sistema nacional de saúde.

Diagnóstico Laboratorial de Infeções por Fungos Filamentosos Implementação e Experiência de 1 ano

GABRIELA ABREU

Serviço de Patologia Clínica, CHVN Gaia/Espinho, EPE

Os fungos são cada vez mais reconhecidos como importantes agentes patogénicos.

Espécies habitualmente encontradas no ambiente têm sido implicadas como importantes causas de doença, particularmente no hospedeiro imunocomprometido. Daí a necessidade do laboratório de Microbiologia ser capaz de isolar e identificar os agentes mais comuns de infeções fúngicas. Devido à metodologia utilizada na identificação destes agentes, nem todos os laboratórios executam este tipo de pesquisa, sendo, nestes casos, o diagnóstico micológico efetuado em laboratórios especializados por profissionais com uma vasta experiência.

A necessidade de implementação da pesquisa de fungos filamentosos no CHVNGaia/Espinho, EPE faz sentido num centro que tem Unidades de Cuidados Intensivos e um Serviço de Broncologia de referência. Esta necessidade acentuou-se com a criação de uma consulta especializada de Dermatologia de pele e faneras. Estas são as principais áreas associadas ao isolamento de fungos filamentosos.

Após um período de formação e acompanhamento de todo o processo de pesquisa de fungos filamentosos, tendo em conta a colheita de amostras, a importância da história clínica do doente, o processamento da amostra, a execução do exame direto e do exame cultural, as características morfológicas macroscópicas e microscópicas das colónias e, em alguns casos, provas bioquímicas e meios especiais,

CONFERÊNCIAS

foi possível a implementação completa deste processo em 2014.

Apresentamos os resultados obtidos durante o primeiro ano em relação a número, tipo de amostras e resultados do exame direto e cultural.

Avanços em Microbiologia Clínica: Diagnóstico Laboratorial de Infecções Anaeróbias em Portugal – Projeto de Investigação

BRUNO COSTA¹

¹Universidade de Santiago de Compostela

Projeto de Investigação realizado no âmbito do Programa de Doutoramento em Avanços em Biologia Microbiana e Parasitaria na Universidade de Santiago de Compostela

Em 1861 Louis Pasteur descobre as bactérias anaeróbias, mas só a partir de 1970 com a criação de sistemas de anaerobiose é que estes microrganismos começam a ser isolados com mais frequência e despertam interesse na comunidade científica^{1,2}. Desprezados ao longo de vários anos, verificou-se que assumem um papel crescente e relevante em várias infeções do trato respiratório, gastrointestinal, genital feminino, sistema nervoso central, partes moles, ossos e articulações e sistema cardiovascular^{2,3}. Estes microrganismos fazem parte da flora microbiana normal e anaeróbia endógena, ajudando a manter o equilíbrio ecológico^{3,4}. No entanto, estas bactérias podem colonizar determinados locais e provocarem infeções graves². As infeções por anaeróbios são na sua grande maioria endógenas, polimicrobianas e mistas, estando muitas vezes associadas a taxas significativas de morbilidade e mortalidade²⁻⁴. Nem todos os laboratórios dispõem de métodos adequados para a recuperação, isolamento e identificação de anaeróbios³. A contaminação de amostras com flora normal, exigência de uma atmosfera de anaerobiose para crescimento, envolvimento de diversas bactérias no processo

infecioso que crescem lentamente exigindo muitos testes para a identificação e terapêutica prévia são os fatores mais apontados para o não processamento destas amostras^{5,6}. A seleção da amostra, colheita, transporte e processamento laboratorial de microrganismos anaeróbios são processos bastante exigentes, sendo que o processamento laboratorial pode ser moroso e dispendioso na sua identificação e testes de susceptibilidade^{3,5,6}. Apesar do crescente interesse pelos anaeróbios a sua pesquisa diminuiu quantitativamente, com exceção do *Clostridium difficile*, muito provavelmente devido à previsibilidade da presença de anaeróbios e tratamento empírico no local da infeção^{3,7}. Com o avanço da instrumentação e tecnologia laboratoriais deparamo-nos com metodologias cada vez mais rápidas e eficientes na identificação de anaeróbios, permitindo orientar o clínico para terapêuticas mais ajustadas tentando evitar o flagelo das resistências bacterianas^{3,7,8}.

Este estudo tem como objetivos conhecer a realidade dos laboratórios de microbiologia em Portugal no que diz respeito ao diagnóstico de infeções anaeróbias; fazer um estudo sobre os principais avanços no diagnóstico laboratorial de infeções anaeróbias e elaborar uma proposta de protocolo experimental de fácil execução e com base em várias rotinas laboratoriais e avanços tecnológicos.

A atualização de conhecimentos nesta área e ajuste de rotinas laboratoriais com o avanço da tecnologia contribuirá para um diagnóstico mais assertivo e rápido de infeções provocadas por microrganismos anaeróbios, permitindo por exemplo ajustar terapêuticas e diminuir o tempo de internamento dos pacientes. A redução dos tempos de internamento dos pacientes levará a uma diminuição de custos no Sistema Nacional de Saúde.

Referências

1. Pasteur L. Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. 1861;52:344-7.
2. Betriu C. Picazo JJ. El papel de los anaerobios en patología infecciosa. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:141-3.

3. García-Sánchez JE, *et al.* Las bacterias anaerobias 150 años después de su descubrimiento por Pasteur. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.012>.
4. García-Sánchez JE, José Fresnandillo M, Gárcia-Sánchez E. Nuevas Bacterias anaeróbicas implicadas en enfermedades infecciosas humanas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:173-84.
5. Citron DM. Specimen collection and transport, anaerobic culture techniques, and identification of anaerobes. *Rev Infect Dis* 1984; 6 Suppl 1:S51.
6. Stoner KA, Rabe LK, Austin MN, *et al.* Quantitative survival of aerobic and anaerobic microorganisms in Port-A-Cul and Copan transport systems. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2739.
7. Schroeder LF, Robilotti E, Peterson LR, Banaei N, Dowdy DW. Economic Evaluation of Laboratory Testing Strategies for Hospital-Associated *Clostridium difficile* Infection. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):489-96.
8. Johansson A, Nagy E, Sóki J, ESGAL. Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with Matrix-assisted laser desorption ionization -Time of flight Mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe.* 2014. pii: S1075-9964(14)00007-9.

Imunodeficiências Primárias – qual o papel da Citometria de Fluxo?

CATARINA MARTINS

NOVA Medical School / Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Nova de Lisboa

As Imunodeficiências Primárias (IDP) são doenças raras, com uma frequência estimada de 1/5000 indivíduos na população geral,^{1 (1)} nas quais se identificam defeitos genéticos dos diferentes componentes do Sistema Imunitário (SI). Os defeitos ao nível do SI podem observar-se no desenvolvimento, na maturação ou na função de células e outros elementos da resposta imune. O largo espectro de doenças que têm vindo a ser reconhecidas como PID estende-se para além das 130 entidades, para as quais foram já identificados mais de 200 genes.^{2 (2)}

O crescente número de entidades tem vindo a ser periodicamente revisto desde a primeira abordagem proposta pela OMS em 1970, sendo de 2014 o último documento de classificação publicado pelo painel de peritos em IDP da *International Union of Immunological Societies* (IUIS).^{3 (3)} Este documento divide as IDP em 9 grupos: I. Imunodeficiências combinadas, II. Imunodeficiências combinadas com características ou síndromes associados, III. Deficiências predominantemente de Anticorpos, IV. Doenças de desregulação imunológica, V. Defeitos Congénitos de Fagócitos (Número, função ou ambos), VI. Defeitos da imunidade inata, VII. Desordens auto-inflamatórias, VIII. Deficiências do Complemento e IX. Fenocópias de PID.

Apesar de classicamente as IDP iniciarem sintomatologia na infância, existem cada vez mais doentes descritos com início de sintomas em idade adulta. Como seria de esperar, as PID predispõem os indivíduos afectados para infecções recorrentes, apresentando também um risco mais elevado para o desenvolvimento de patologias do foro alérgico, auto-imune e malignidades. O seu diagnóstico precoce permite a optimização da prestação de cuidados, permitindo diminuir a morbilidade e mortalidade associadas a estas doenças.^{1 (1)}

A investigação de uma IDP depende das manifestações clínicas e dos elementos identificados na história clínica. A reconhecida heterogeneidade nas manifestações clínicas e imunológicas das IDP representa um desafio ao nível do seu diagnóstico. É a este nível que a Citometria de Fluxo assume um papel de destaque. Para isso, tem contribuído o facto de ser uma técnica com elevada sensibilidade, com protocolos de resposta relativamente rápida e com capacidade de avaliar, em simultâneo, várias características de uma célula (análise multiparamétrica).⁴ Assim, no âmbito das IDP, a Citometria de Fluxo através da utilização de painéis de imunofenotipagem básicos e mais diferenciados, permite ensaios de caracterização da expressão de proteínas ou factores de transcrição em populações alvo, mas estende-se também a ensaios funcionais

CONFERÊNCIAS

de aplicações múltiplas (desde a avaliação da capacidade de produção de citocinas e outros mediadores imunes, à análise da capacidade oxidativa ou da capacidade proliferativa das células). De facto, nas últimas décadas, tem crescido substancialmente o número de IDP para as quais a Citometria de Fluxo tem uma resposta efectiva, incluindo elementos importantes para o diagnóstico, o prognóstico e a monitorização dos doentes.^{4,5} Actualmente, o doseamento dos níveis séricos de várias citocinas, imunoglobulinas ou proteínas de fase aguda, pode ser também efectuado por Citometria de Fluxo, através de estratégias *multiplex*.

Apesar de continuar a ser imperativa a confirmação do diagnóstico por testes genéticos ou análise de mutações, desde que disponíveis, a contribuição da Citometria de Fluxo para o diagnóstico das IDP é de inestimável valor. Nesta apresentação, vão abordar-se aplicações da Citometria de Fluxo que têm sido utilizadas no diagnóstico laboratorial de IDP, distribuídas em em três categorias: anomalias em subpopulações celulares, anomalias no padrão de expressão de marcadores e anomalias funcionais.

Referências

1. Picard C. How to investigate a hereditary immunodeficiency? *Rev Prat.* 2007 Oct 15;57(15):1671-6.
2. Jonkman-Berk BM, van den Berg JM, Ten Berge IJ, Bredius RG, Driessen GJ, Dalm VA, van Dissel JT, van Deuren M, Ellerbroek PM, van der Flier M, van Hagen PM, van Montfrans JM, Rutgers A, Schölvink EH, de Vries E, van Beem RT, Kuijpers TW. Primary immunodeficiencies in the Netherlands: National patient data demonstrate the increased risk of malignancy. *Clin Immunol.* 2015 Feb;156(2):154-62. doi: 10.1016/j.clim.2014.10.003. Epub 2014 Oct 24.
3. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Gaspar HB, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck JM, Sullivan K, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol.* 2014 Apr 22;5:162. doi: 10.3389/fimmu.2014.00162. eCollection 2014.
4. O'Gorman M. Role of Flow Cytometry in the Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiency Disease. In O'Gorman M, Donnenberg A, eds. *Handbook of Human Immunology*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008: 267-311. ISBN 0-8493-1984-6.
5. Oliveira JB, Notarangelo LD, Fleisher TA. Applications of flow cytometry for the study of primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008 Dec;8(6):499-509. doi: 10.1097/ACI.0b013e328312c790.

Tempo de geração de trombina, na presença de trombomodulina, para avaliação do risco de trombose em doentes com défice na via da proteína C

A. CRISTINA OLIVEIRA, T. FIDALGO, P. MARTINHO, C. SILVA
PINTO, E. GONÇALVES, D. MARQUES, T. SEVIVAS, R. SALVADO
E M. L. RIBEIRO

*Serviço de Hematologia CHC, Centro Hospitalar
Universitário de Coimbra, E.P.E., Portugal*

Introdução: A medição do potencial endógeno de trombina (PET) de cada indivíduo pode proporcionar um método para a quantificação do efeito composto de múltiplos factores de risco. Níveis aumentados do PET têm sido associados a um maior risco de ocorrência de um primeiro evento de trombose venosa.

A trombomodulina (TM), glicoproteína de membrana presente na superfície endotelial, funciona como receptor para a trombina e catalisa a activação do sistema da proteína C (PC). A adição de TM ao ensaio de geração de trombina (GT) permite detectar pequenas flutuações na actividade das proteínas implicadas na via da PC, incluindo a diminuição dos níveis de PC e alterações na sua activação. Este ensaio reflecte o que ocorre *in vivo*, e é um teste robusto para avaliar o balanço global entre factores pro- e anticoagulantes.

Objectivos: Avaliar a sensibilidade do ensaio de GT com TM para detectar o potencial endógeno de

CONFERÊNCIAS

trombina em doentes com comprometimento do sistema da PC.

Material/Métodos: Foram estudadas 87 amostras: 20 controlos saudáveis e 52 doentes com défices do sistema da PC (27 Proteína S (PS), 9 PC y 16 FV Leiden em heterozigotia). Foram também estudados 15 doentes com a variante de PRT G20210A (sistema PC normal).

A GT foi medida em plasma pobre em plaquetas com 5pM de factor tecidular e 4uM fosfolípidos, na presença ou ausência de TM usando o método Calibrated Automated Thrombogram (CAT- Stago).

Resultados: No ensaio sem TM não se observaram diferenças significativas do PET entre o grupo controlo e os doentes com défices de PC, PS e FV Leiden. Com a adição de TM ao ensaio, o PET reduziu em média 51% nos controlos e nos défices de PC 23% ($p<0,0001$), PS 20% ($p<0,0001$) y FV Leiden 30% ($p=0.0010$). Nos 15 doentes com PRT G20210A, observou-se uma diferença com adição de TM igual à dos controlos (47%), confirmando a ausência de comprometimento da via PC/PS.

No grupo com défices de PS (21 propósitos e 6 familiares) efectuou-se uma análise tendo em conta

os estudos moleculares do gene *PROS1*: 4 com mutações missense e 3 frameshift (PS:8-27%); 9 com PS Heerlen (PS:37-72%) e 11 sem alterações identificadas (PS:35-63%). A inibição da GT mais significativa após adição de TM (12%), observou-se nos doentes do primeiro grupo, com níveis mais baixos de PS e valores de PET (798-1604). Nos doentes com níveis mais ligeiros de PS (PS Heerlen e sem mutação identificada) o range do PET não é tão alargado (Tabela 1).

Discussão: Os nossos resultados mostram que a adição de TM faz da GT um teste sensível à via de inibição da PC. A resistência à inibição pela TM foi mais evidente nos défices de PS/PC que no FV Leiden, existindo uma associação com o grau de comprometimento da via da PC. Além disso, este comprometimento foi evidenciado no grupo de doentes com ou sem mutação *PROS1*, permitindo relacionar a severidade do fenótipo com o grau de inibição da GT e o tipo de mutação. Devido à heterogeneidade de valores do PET nos indivíduos com níveis plasmáticos similares, o TGT revelou-se um ensaio complementar à quantificação de PC/PS e poderá adicionar uma avaliação do risco individual de trombose.

Tabela 1 – Geração de trombina em 20 controlos saudáveis e 67doentes (27 com défice de PS, 9 com défice de PC, 16 com FV Leiden e 15 com a variante de PRT G20210A) em plasma pobre em plaquetas com 5pM de factor tecidular (FT) e 4uM fosfolípidos (PPL) na presença ou ausência de trombomodulina (TM).

	n	PC/ PS (%)	PET sin TM (min – max) (nM•min)	PET con TM (min - max) (nM•min)	% inhib. com TM	Pico sem TM (min – max) (nM)	Pico com TM (min - max) (nM)
Controlos	20	-	809 - 1477	250 - 761*	51	172 - 335	70 - 214
Défice PC	9	53	897 - 1428	560 – 1113*	23	231 - 292	131 - 284
FV Leiden	16	-	697 - 1235	300 – 956*	33	103 - 287	81 - 228
Défice PS							
Missense, frameshift	7	20	885 - 1780	798 - 1604*	12	257 - 446	243 - 433
PS Heerlen	9	53	799 - 1312	596 - 1205*	22	207 - 381	168 - 372
Sem mutação identificada	11	52	837 - 1447	655 - 1205*	20	226 - 353	176 – 300
PRT G20210A	15	-	976 - 1846	407 – 1255	47	199 - 433	104 - 315

* $p<0.05$

PC - Proteína C; PS – Proteína S; PET – Potencial endógeno de trombina; Inib. – inibição;

CONFERÊNCIAS

Fármacos no ambiente: estará o ambiente sobremedicado?

LÚCIA H.M.L.M. SANTOS

REQUIMTE /LAQV/ Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto

Em todo o mundo há mais de 4000 fármacos a serem utilizados tanto em medicina humana como veterinária, ou como promotores de crescimento [1]. Destes cerca de 600 fármacos já foram detetados no ambiente [2].

Os fármacos podem entrar no ambiente através de diferentes vias, sendo de salientar: a sua dispersão direta; entrada através das águas residuais (ex. efluentes da indústria farmacêutica, efluentes hospitalares, sistemas de esgotos urbanos); ou através da utilização das lamas das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) ou do estrume animal como fertilizante em campos agrícolas [3]. Uma das formas mais comum de entrada dos fármacos no ambiente é através da sua excreção na urina e/ou nas fezes, tanto como composto-pai ou na forma de metabolitos. Deste modo os fármacos são encaminhados para as ETARs, onde são tratados juntamente com todos os outros constituintes das águas residuais. No entanto, a tecnologia utilizada atualmente nas ETARs não é capaz de remover eficazmente a totalidade dos fármacos, fazendo com que estes estejam presentes nos seus efluentes, sendo, assim, encaminhados para as águas de superfície [3].

Uma vez que os fármacos são desenhados para terem um modo específico de ação, a exposição prolongada dos organismos aquáticos a baixas concentrações destes compostos, conjuntamente com outros contaminantes, poderá causar um impacto negativo nos diferentes ecossistemas [3]. Por exemplo, a exposição contínua dos peixes ao etinilestradiol, uma hormona sexual feminina presente na maior parte das pílulas contraceptivas, contribui para a feminização dos peixes macho, comprometendo a sua reprodução, e colocando as espécies em risco de extinção devido

a perderem as capacidades reprodutivas [4]. Efeitos semelhantes estão descritos para os antidepressivos, que podem também alterar o comportamento dos peixes, tornando-os mais suscetíveis aos predadores [5]. A presença de antibióticos no ambiente é outra grande preocupação, devido ao potencial impacto na seleção de bactérias multi-resistentes. Contudo, a informação existente até ao momento não é clara, não se tendo provado uma relação de causa-efeito entre a presença de antibióticos no ambiente e a seleção de bactérias resistentes a antibióticos [1].

A problemática dos fármacos no ambiente tem recebido uma atenção crescente por parte das entidades reguladoras, como pode ser comprovado pela criação de uma "Watch list" pela Comissão Europeia na última revisão da Lei-quadro da Água, que inclui três fármacos (etinilestradiol, estradiol e diclofenac) [6].

No futuro é necessário continuar a monitorizar a presença de fármacos no ambiente, bem como avaliar a sua acumulação e investigar os seus efeitos a longo prazo para a fauna, flora e mesmo para o homem, devido a uma exposição contínua. Paralelamente também terá de se apostar em estratégias mais eficazes para a remoção de fármacos, de modo a limitar a sua entrada e impacto no ambiente.

Referências

- [1] Boxall ABA et al. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What are the Big Questions? *Environ Health Perspect* 2012; 120:1221-9.
- [2] Küster A, Adler N. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. *Phil Trans R Soc B* 2014; 369: 20130587.
- [3] Santos LHMLM, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MCBSM. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mat* 2010; 175: 45-95.
- [4] Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 8897-8901.
- [5] Calisto V, Esteves VI. Psychiatric pharmaceuticals in the

CONFERÊNCIAS

environment. *Chemosphere* 2009; 77: 1257-74.

[6] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off J Europ Union* 2013; L226: 1-17.

A actualidade no Laboratório de Imuno-hematologia

ANA PALMIRA AMARAL

SSMT, CHTV, EPE

A Imuno-hematologia estuda os antígenos eritrocitários, os anticorpos correspondentes e a sua importância clínica. O laboratório de Imuno-hematologia é uma ferramenta indispensável a uma prática clínica de excelência na Medicina Transfusional e em patologias como a Anemia Hemolítica Auto-imune ou a Doença Hemolítica do Recém-nascido.

Um dos mais notáveis avanços em medicina na primeira metade do século XX, em particular nas áreas da imuno-hematologia e medicina transfusional, foi a identificação dos antígenos eritrocitários humanos. Desde os primeiros trabalhos pioneiros de Karl Landsteiner (1900) que o conhecimento na área da medicina transfusional tem tido grandes desenvolvimentos. De facto, a descoberta do sistema sanguíneo ABO foi uma realização importante na história da transfusão sanguínea seguida da descoberta do antígeno Rh(D). Durante o século XX, o conhecimento dos grupos sanguíneos cresceu de 3 antígenos [A, B, e O (mais tarde foi descoberto que é o antígeno H)] até cerca de 300. A grande maioria dos antígenos eritrocitários está dividida em 30 sistemas sanguíneos. O gene (ou uma pequena família de gene para os sistemas MNS, Rh e Ch/rg) que codifica cada sistema foi clonado e sequenciada (o gene do sistema P1 ainda não foi descrito) e as bases moleculares associadas à grande maioria dos antígenos eritrocitários foram descritas. Os eritrócitos portadores de um determinado antígeno

podem provocar uma resposta imunológica, se introduzidos no organismo de um indivíduo que não possui esse antígeno. É o anticorpo assim produzido que é responsável pelos problemas na prática transfusional, tais como incompatibilidade sanguínea dador/receptor, incompatibilidade materno-fetal e anemia hemolítica auto-imune. Com base nestes conhecimentos, foram desenvolvidos nos últimos 60 anos, testes serológicos para identificação dos antígenos na superfície dos eritrócitos.

Nos nossos dias, foram caracterizados mais de 300 antígenos eritrocitários. Quase todos foram identificados através de técnicas de aglutinação, o “gold standard” da transfusão. A aglutinação é sensível e pouco onerosa e, quando são aplicados os algoritmos correctos, é um método eficiente e relativamente seguro de selecção de sangue para transfusão. No entanto, existem limites à sua utilização como único método para determinar que o doente certo recebe o sangue certo na altura certa. Por outro lado, a tipagem serológica dos antígenos eritrocitários pode ser comprometida por vários factores, entre eles transfusões prévias recentes e um teste antiglobulina directo positivo. Neste sentido, a análise baseada em estudos de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) começa a ganhar importância. De facto, o campo da imuno-hematologia começa a perceber que a genotipagem dos grupos sanguíneos traz benefícios para os doentes que necessitam de transfusões.

A área da Imuno-hematologia é fortemente regulada, obrigando a uma actualização constante dos métodos e dos profissionais para uma manutenção criteriosa dos padrões de qualidade exigidos. Para isso, deve ser implementado e mantido um sistema de qualidade robusto transversal a todo o processo desde a entrada da amostra com o pedido de componentes, passando pelo estudo dos doentes e dadores até à escolha do componente adequado a cada caso. A responsabilidade que recai sobre todos os intervenientes do processo deve ser compreendida e respeitada e o trabalho deve ser desenvolvido dentro das boas práticas clínicas e laboratoriais.

CONFERÊNCIAS

Ciências Biomédicas Laboratoriais

MARISA BARBEIRA

Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Castelo Branco

A Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco apresentará, no próximo ano letivo (2015/2016) como oferta formativa o Curso de Ciências Biomédicas Laboratoriais.

O curso de Ciências Biomédicas Laboratoriais visa formar diplomados com um perfil profissional caracterizado por uma série alargada de capacidades e competências que lhes permitam abranger a área das Análises Clínicas e Saúde Pública e da Anatomia Patológica Citológica e Tanatológica. Possibilita o exercício independente e autónomo, devidamente

regulamentado, segundo a legislação Portuguesa, das atuais profissões de Técnico de Análises Clínicas e de Saúde Pública e de Anatomia Patológica Citológica e Tanatológica.

Os planos de estudo do curso correspondem a uma formação com a duração de 240 ECTS (4 anos letivos) e desenvolvem-se em torno do perfil de competências que visam promover a integração de conhecimentos e capacidades que contribuam para o exercício qualificado das profissões e para a mobilidade no Espaço Europeu. Pretende-se a realização de atividades nos domínios do ensino, formação profissional, investigação científica, inovação tecnológica, produção e divulgação do conhecimento e prestação de cuidados e serviços orientados para a saúde e desenvolvimento da comunidade.



XII CONGRESSO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

COMUNICAÇÕES LIVRES

Uma década de MIP (Marker Identification Profile) em diagnóstico pré-natal 43

NUNO MAIA, ROSÁRIO SANTOS, PAULA JORGE

Unidade de Genética Molecular, Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Centro Hospitalar do Porto, CHP, E.P.E.

Frequência de aloanticorpos em pacientes politransfundidos no CHBV- Aveiro, E.P.E..... 43

MARIA J. SILVEIRA, ELISABETH MESQUITA, LUCIA BORGES

Centro Hospitalar do Baixo Vouga E.P.E. - Aveiro

Síndromes Mielodisplásicas 44

BRAGANÇA, F, SILVEIRA M

Lab. de Hematologia, Serv. de Pat. Clínica, IPOLFG EPE

Interferências nas contagens celulares do Cell-Dyn Sapphire 45

BRAGANÇA F, QUARESMA C, BARREIRA R, SILVEIRA M

Lab. de Hematologia, Serv. de Pat. Clínica, IPOLFG EPE

Uma década de MIP (Marker Identification Profile) em diagnóstico pré-natal

NUNO MAIA, ROSÁRIO SANTOS, PAULA JORGE

Unidade de Genética Molecular, Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Centro Hospitalar do Porto, CHP, E.P.E.

Introdução

A Unidade de Genética Molecular do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães – C.H.P. realiza várias análises pré-natais onde se incluem o rastreio rápido de aneuploidias, a determinação do sexo fetal e zigotia (em gravidezes gemelares) e o despiste de contaminação materna. Estes rastreios são baseados na amplificação e análise de marcadores microssatélite (short tandem repeat - STRs) localizados nos cromossomas 13, 18, 21, X e Y, bem como de regiões não-polimórficas localizadas nos genes AMELXY, SRY, ZFX e ZFY, e denominam-se por Marker Identification Profile (MIP).

Objetivos

Avaliar os resultados obtidos entre 2005 e 2015 e a aplicação de metodologias moleculares no diagnóstico pré-natal.

Material e Métodos

Este trabalho consiste na análise retrospectiva dos resultados de 1140 estudos pré-natais, bem como na apresentação da evolução das metodologias moleculares, nomeadamente o Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) e o PCR de fluorescência quantitativo (QF-PCR).

Resultados

Das amostras recebidas no nosso laboratório, 51,8% correspondem a líquido amniótico e 6,4% a vilosidades coriônicas. As restantes amostras fetais incluem culturas celulares, produtos de abortamento e ADN já extraído.

No total foram realizados 555 rastreios de aneuploidias, 445 despistes de contaminação materna, 122 determinações de zigotia e rastreio

de aneuploidias em gravidezes gemelares e 18 determinações de sexo fetal.

Relativamente ao rastreio de aneuploidias foram obtidos resultados normais em 85,7% e positivos em 8,1% dos casos. Nos restantes não foi possível obter um resultado devido à presença de elevada contaminação materna ou por má qualidade de ADN fetal. Todos os resultados foram confirmados com o obtido no cariótipo. Assim, este estudo apresenta uma especificidade, sensibilidade e valor preditivo positivo de 100%, sendo que a taxa de falsos positivos e negativos foi de 0%.

Das amostras que chegaram ao nosso laboratório para despiste de contaminação materna apenas 2% apresentaram presença de material materno.

Conclusões

Em dez anos de rastreios moleculares e de evolução tecnológica podemos concluir que o QF-PCR pode ser utilizado como metodologia única no rastreio rápido de aneuploidias mais comuns em casos muito particulares como por exemplo para confirmar resultados obtidos em testes pré-natais não invasivos, desempenhando ainda um papel preponderante na exclusão de contaminação materna em todos os estudos pré-natais, quer sejam moleculares, citogenéticos ou bioquímicos.

Frequência de aloanticorpos em pacientes politransfundidos no CHBV- Aveiro, E.P.E.

MARIA J. SILVEIRA, ELISABETH MESQUITA, LUCIA BORGES

Centro Hospitalar do Baixo Vouga E.P.E. - Aveiro

Introdução

As transfusões sanguíneas podem beneficiar e/ou prejudicar o doente. Estas realizam-se para aumentar a capacidade do sangue para transportar oxigénio, restaurar o volume de sangue do corpo, melhorar a imunidade e corrigir problemas de coagulação. No entanto podem apresentar riscos, sendo um deles a formação de anticorpos contra um ou mais antígenos

COMUNICAÇÕES LIVRES

eritrocitários levando a disparidades genéticas entre dador e receptor. A produção de aloanticorpos pode causar grandes problemas na terapia de transfusão de longo prazo, no entanto, ainda originam riscos para o receptor, como reacções alérgicas e infecções. O risco de exposição depende do receptor para o antígeno estranho e a sua imunogenicidade. Assim, factores como genética, frequência de transfusões efectuadas e factores relacionados com o paciente, influenciam na reacção do sistema imunológico do paciente.

Objetivo

Determinar a taxa de frequência de aloanticorpos em pacientes politransfundidos no CHBV-Aveiro, no ano de 2014 e verificar qual o sistema mais frequente.

Material e Métodos

O estudo realizado foi retrospectivo. A amostragem foi constituída pelos resultados da pesquisa de anticorpos irregulares positiva e respectiva identificação de todas as amostras analisadas no serviço de Imuno-hemoterapia do CHBV- Aveiro, no ano de 2014. Os dados foram obtidos do sistema informático Asis e tratados em programa Excel.

Resultados

Das 900 transfusões efectuadas no ano de 2014, verificou-se que 100 pacientes eram politransfundidos, sendo a taxa de doentes com pesquisa de anticorpos irregulares positiva de 10%. Relativamente à identificação de anticorpos irregulares o sistema mais frequente é o sistema Rh, apresentando uma taxa de 80% nos respectivos anticorpos (D,C,c,E,e).

Conclusão

Tendo em conta os resultados obtidos no CHBV-Aveiro, verificou-se que os anticorpos do sistema Rh são o sistema mais encontrado nos pacientes politransfundidos, apresentando uma taxa de 80%, o que vai de encontro ao que está descrito. Deste modo, e devido às limitações da fenotipagem, uma vez que a presença de eritrócitos do dador na circulação do

doente com transfusão recente, dificulta a correcta fenotipagem, poderia ser uma excelente alternativa, a introdução de técnicas de genotipagem dos grupos sanguíneos.

Síndromes Mielodisplásicas

BRAGANÇA, F, SILVEIRA M

Lab. de Hematologia, Serv. de Pat. Clínica, IPOLFG EPE

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo de patologias clonais que afetam as células precursoras pluripotentes e que se caracterizam por citopenias acompanhadas de displasia em uma ou mais das três séries hematopoiéticas. Os doentes apresentam geralmente uma ou mais citopenias que se definem, segundo o International Prognostic Scoring System (IPSS) por: hemoglobina < 10g/dL, neutrófilos <1,8x10⁹/L e plaquetas <100x10⁹/L. A importância do estudo destas patologias deve-se à sua associação com mortalidade e morbilidade significativas, por infeções, hemorragias, anemia e a uma tendência de progressão para leucemia aguda (LA). São patologias raras, com uma incidência global de 5 casos/100000 pessoas ano, mas que passa para 20-50 casos/100000 pessoas ano em adultos > 60 anos, sendo a idade média de aparecimento de 70 anos e com uma probabilidade de progressão para LA de 30%. Este trabalho tem como objetivo dar a conhecer o que é a displasia, assim como a classificação de SMD da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008) e os seus respetivos fundamentos.

Para o diagnóstico de SMD é importante ter em conta a história clínica, o exame físico, a realização de determinações laboratoriais, em especial o hemograma e a respetiva morfologia do sangue periférico, o exame da medula óssea (mielograma e biópsia óssea) e principalmente a exclusão de outras causas de displasia não-clonais. O diagnóstico laboratorial de SMD baseia-se na morfologia de sangue periférico (SP) e Medula Óssea (MO)

COMUNICAÇÕES LIVRES

de forma a determinar a presença e o grau de displasia. O estudo de anomalias citogenéticas, além de confirmar a clonalidade da patologia, permite estabelecer uma ligação com algumas alterações morfológicas e pode ainda ajudar no prognóstico.

Interferências nas contagens celulares do Cell-Dyn Sapphire

BRAGANÇA F, QUARESMA C, BARREIRA R, SILVEIRA M

Lab. de Hematologia, Serv. de Pat. Clínica, IPOLFG EPE

Os avanços das últimas décadas nos contadores hematológicos, permitem-nos obter resultados de contagens celulares/hemogramas de forma rápida, barata e na grande maioria das vezes fiáveis. O Cell-Dyn Sapphire combina a impedância eléctrica com a dispersão óptica para contagem de eritrócitos e plaquetas e utiliza a dispersão óptica combinada com fluorescência para determinação de leucócitos (e contagem diferencial), eritroblastos e reticulócitos. Contudo, a execução do hemograma e respectiva interpretação não podem ser vistas como actos mecânicos, desprovidos de uma análise crítica e devem ser muitas vezes acompanhados por observação

microscópica do esfregaço de sangue periférico.

Como qualquer técnica/determinação laboratorial, os analisadores possuem limitações e interferências que devem ser tomadas em consideração. É objectivo deste trabalho dar a conhecer algumas limitações e/ou interferências do Cell-Dyn Sapphire com as quais nos deparamos na nossa rotina laboratorial.

A acompanhar os resultados, os analisadores fornecem dados adicionais que podem ser simplesmente avisos morfológicos relativos à amostra ou podem ser alarmes a denunciar possíveis limitações e/ou interferências. Estas interferências podem ocorrer nos seguintes casos: alarme rstrBC (interferência por pequenos linfócitos ou em caso de doença linfoproliferativa), alarme PLtClmp (presença de plaquetas gigantes), NRBC (anomalia de pseudo-Pelger-Huet), Basofilia (anomalia de pseudo-Pelger-Huet e hipogranulação), monocitose (hipogranulação dos neutrófilos).

Cabe a cada serviço/profissional saber o que fazer com esses dados e adaptar possíveis medidas correctivas de acordo com a sua realidade laboratorial, sendo de realçar a importância da observação do esfregaço de sangue periférico sempre que surjam dúvidas relativamente ao resultado produzido pelo contador celular.



XII CONGRESSO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

COMUNICAÇÕES PÓSTER

Doseamento da Troponina Ultra Sensível no Diagnóstico de Enfarte Agudo do Miocárdio

– Variação Entre Géneros..... 47

M. FERREIRA

Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga EPE

Caracterização do perfil hematológico de uma população envelhecida em função da sua atividade física e estado nutricional 48

ANABELA MOREIRA^{1,2}, RAFAEL LOURO¹, STÉPHANIE FERREIRA^{1,2}, SANDRA MOTA^{1,2}, MANUELA AMORIM^{1,2}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, ² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente – ESTSP-IPP

Perfil de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com suspeita clínica de malária..... 49

VANESSA MARTINS, ROSA TEODÓSIO, MARCELO SOUSA SILVA

Unidade de Ensino e Investigação Clínica Tropical, Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa – Portugal

Alteração do perfil lipídico em pacientes com esquizofrenia 50

PAULA OLIVEIRA¹, MARIA SOUSA^{1,2}, STÉPHANIE FERREIRA^{1,2}, ANABELA MOREIRA^{1,2}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto – Instituto Politécnico do Porto, ² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), ESTSP-IPP

Desenvolvimento de métodos serológicos para diagnóstico de giardiose usando uma proteína recombinante β -giardina de *Giardia lamblia* 51

PEDRO HENRIQUES¹, ANDRÉ ALMEIDA^{1,2}, MARIA LURDES DELGADO¹, ANTÓNIA CONCEIÇÃO^{2,3}, JOSE MANUEL COSTA^{1,2}, ANTONIO CASTRO^{1,2}

¹Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, ²ICETA-CECA, Centro de Estudos em Ciência Animal, ³Escola Superior Agrária de Coimbra

Espondilite Anquilosante: Alterações nos perfis lipídico e inflamatório 51

NÁDIA VALÉRIO¹, MARIA MANUELA AMORIM^{1,2}, STÉPHANIE LOPES FERREIRA^{1,2}, SANDRA MARLENE MOTA^{1,2}, TERESA MOREIRA^{1,2}, ANABELA MOREIRA^{1,2}

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, ² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente – ESTSP-IPP

Métodos complementares de diagnóstico laboratorial da Leucemia Promielocítica Aguda 52

BARBOSA A, SANTOS C, OLIVEIRA J, LOPES M, AMORIM ML, SOARES MJ, GOMES MP

Centro Hospitalar São João, EPE

Malária e Dádiva de Sangue: Comparação de critérios clínicos e serológicos na seleção de potenciais dadores de sangue com estadias em zona endémica..... 53

DANIELA PORTUGAL-CALISTO, MARCELO SOUSA SILVA, ANA FERREIRA, ROSA TEODÓSIO

Unidade de Ensino e Investigação de Clínica Tropical, Global Health and Tropical Medicine, Inst. de Higiene e Medicina Tropical, Univ. Nova de Lisboa, Lisboa

Avanços Tecnológicos em Hematologia Laboratorial – Sysmex® XN9000™ Series 54

CARDOSO S, CLEMENTE S, FARIA C, GONÇALO A, SERRA C, MENDES C

Serviço de Hematologia Laboratorial, Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE

Estudo do tubo S-Monovette® GlucoEXACT/3,1 mL 55

LEITE, DANIELA; ROCHA, ANDREIA; LOBO, EUGÉNIA

¹Serviço Patologia Clínica, C. H. entre Douro e Vouga

Laboratory Diagnosis of Hodgkin Lymphoma..... 55

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco (Portugal)

²Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã (Portugal)

Laboratory Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia 56

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco (Portugal)

²Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã (Portugal)

Laboratory Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia 56

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco (Portugal)

²Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã (Portugal)

COMUNICAÇÕES PÓSTER

Doseamento da Troponina Ultra Sensível no Diagnóstico de Enfarte Agudo do Miocárdio – Variação Entre Géneros

M. FERREIRA

Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga EPE

Introdução

As troponinas cardíacas, introduzidas, no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio (EAM), inicialmente em 2000¹, pelas diretrizes conjuntas da American College of Cardiology (ACC) e da European Society of Cardiology (ESC), e atualizadas em 2007, são consideradas, atualmente, os biomarcadores bioquímicos padrão de necrose miocárdica, dada a sua cardio-seletividade e ratio sinal / ruído elevado (o ruído depende do limiar de deteção da troponina, que com os testes atuais é muitíssimo baixo². É importante analisar sempre os resultados de cTnI no contexto do tempo decorrido, incluindo o momento em que o doente deu entrada no hospital. De acordo com as recomendações publicadas, sugere-se a realização de testes em série de cTnI em intervalos de 2 a 4 horas até 12 a 24 horas para avaliar a evolução de cTnI⁵. A associação entre troponina I e risco cardiovascular é significativa, inclusivamente em níveis de cTnI indetectáveis por métodos convencionais para TnI. O mesmo se verifica para mortalidade de causa coronária. Foi concluído que a determinação de cTnI por método de alta sensibilidade pode prever a doença cardiovascular na população geral de meia idade, tanto em homens como em mulheres. Desta forma podemos considerar a cTnI, um marcador específico de risco cardiovascular global, que pode ser englobado nos scores de risco cardiovascular, no âmbito da prevenção primária desta patologia⁶.

Objetivo

Avaliar o desempenho da troponina ultra sensível no diagnóstico do EAM, bem como, a sua variação entre o sexo masculino e feminino.

Métodos

Trata-se de um estudo observacional de carácter descritivo, designadamente de natureza retrospectiva na medida que se procedeu a uma recolha de dados do registo de pacientes admitidos no serviço de Urgência do Centro Hospitalar do Baixo Vouga no período decorrido entre Dezembro de 2014 a Fevereiro de 2015. Foram incluídos no presente estudo todos os pacientes que foram (1) admitidos com suspeita de EAM, e (2) consecutivamente internados na UCIC com diagnóstico de EAM em que tivessem sido (3) obtidos pelo menos dois doseamentos de troponina no Laboratório de Patologia Clínica do CHBV. Neste estudo, utilizou-se um método de amostragem do tipo probabilístico, sendo a amostra constituída por 45 pacientes de todas as classes etárias em que eram elementos do sexo feminino e do sexo masculino. Foi recolhida informação sobre (1) género, e (2) idade de todos os pacientes incluídos na amostra, (3) valor do doseamento da troponina na admissão no serviço de urgência, (4) valor do doseamento da troponina no internamento na UCIC. Deste modo e para simplificar o estudo, optou-se por categorizar a amostra em, três grupos, sendo estes representativos de diferentes intervalos de medições de cTnI (< 1 ng/ml; 1 a 5 ng/ml e > 5 ng/ml). Este estudo foi obtido através do aparelho ADVIA Centaur® da Siemens. Por fim, os dados recolhidos foram tratados numa base de dados no software "Microsoft Office Excel 2010".

Resultados

No contexto do presente estudo, foram submetidas à avaliação 44 pacientes. Deste modo a amostra em estudo era constituído por 30 (68%) elementos do sexo masculino e 14 (32%) elementos do sexo feminino. Sendo assim, e analisando a distribuição etária consoante os géneros na amostra em estudo, verificou-se que no caso do sexo masculino o EAM, têm maior incidência na faixa etária dos 65 a 75 anos, seguida da faixa etária < 65 anos, enquanto que no sexo feminino a maior incidência é na faixa

etária > 75 anos, precedida da faixa etária dos 65 a 75 anos. Relativamente ao doseamento da cTnI, verificou-se que o sexo masculino apresentou valores mais elevados em todos os intervalos de medições na admissão do Serviço de Urgência, não se verificando a mesma situação relativamente aos doseamentos efetuados na UCIC, que por sua vez se apresentaram mais baixos. No sexo feminino verificaram-se valores mais baixos de doseamento de cTnI na admissão ao Serviço de Urgência, tendo-se verificado o inverso nos doseamentos efetuados na UCIC.

Conclusão

As determinações de cTnI auxiliam no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio e na estratificação de risco em doentes com síndromes coronárias agudas relativamente ao risco relativo de mortalidade ou aumento da probabilidade de eventos isquémicos que requerem procedimentos de revascularização de emergência. Após análise dos dados apresentados chegou-se à conclusão que o sexo feminino, apresenta doseamentos mais baixos de cTnI, no diagnóstico de EAM aquando da admissão no Serviço de Urgência. Não é possível tirar conclusões definitivas no presente estudo, devido a algumas limitações e variáveis não controláveis, entre elas o número reduzido da amostra em estudo, a chegada do doente ao serviço de urgência e o tempo de colheita da amostra. Fica em aberto a etiologia desta, sendo pertinente o desenvolvimento de projetos de investigação em larga escala, usando estudos prospetivos, se possível randomizados e controlados.

Caracterização do perfil hematológico de uma população envelhecida em função da sua atividade física e estado nutricional

ANABELA MOREIRA^{1,2}, RAFAEL LOURO¹, STÉPHANIE FERREIRA^{1,2}, SANDRA MOTA^{1,2}, MANUELA AMORIM^{1,2}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente – ESTSP-IPP

Introdução

Nos países desenvolvidos tem-se verificado um acentuado envelhecimento populacional. O processo de envelhecimento implica alterações ao nível da constituição corporal, sendo frequentes alterações no estado nutricional, na capacidade física e motora, refletidas na maior incidência e progressão de patologias nesta população. Assim, é importante identificar fatores modificáveis que permitam melhorar ou manter a qualidade de vida desta população. O estado de saúde do indivíduo pode ser avaliado através de indicadores analíticos, incluindo o hemograma.

Objetivos

Caracterizar o perfil hematológico de uma população idosa em função da sua atividade física e estado nutricional.

Material e Métodos

A amostra foi constituída por 27 indivíduos com idades compreendidas entre 59 e 82 anos. A atividade física e a dieta dos participantes foi determinada pela aplicação de questionários. Para cada indivíduo, a atividade física foi categorizada em *baixa*, *moderada* e *elevada*. Os valores obtidos da frequência alimentar foram classificados como *abaixo* e *acima da Dose Diária Recomendada* (DDR). A cada indivíduo foi realizado um hemograma. Os valores dos parâmetros hematológicos foram comparados entre grupos através de análise estatística multivariada ($\alpha = 0,05$).

COMUNICAÇÕES PÓSTER

Resultados

Pela comparação dos valores do hemograma entre os diferentes grupos de atividade física, observaram-se diferenças estatisticamente significativas no eritrograma, nomeadamente nos parâmetros reticulócitos e reticulócitos de baixa fluorescência. Do mesmo modo, a análise de variação dos valores de hemograma com o estado nutricional, evidenciou alterações em diversos parâmetros face aos intervalos de referência nas DDR.

Conclusão

Estudos longitudinais e com maior amostra são necessários para uma melhor compreensão sobre a influência do exercício físico e da alimentação nos parâmetros hematológicos de uma população envelhecida. Esta informação pode ser importante já que uma melhoria dos valores hematológicos pode levar a maior qualidade de vida desta população, com maior resistência ao cansaço e a redução da mortalidade em pacientes com outras comorbilidades, como insuficiências cardíaca e renal.

Perfil de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com suspeita clínica de malária

VANESSA MARTINS, ROSA TEODÓSIO, MARCELO SOUSA SILVA

Unidade de Ensino e Investigação Clínica Tropical, Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa – Portugal

Introdução e Objetivos

Devido às migrações populacionais entre Portugal e os países situados em regiões endémicas, a malária, na sua forma importada, continua a aparecer de forma esporádica. O parasita *Plasmodium falciparum* pode ativar diversos mecanismos de resposta imune no hospedeiro habitualmente referidos como “imunidade inata” onde atuam fatores humorais, como as proteínas do complemento (com especial

ênfase da C5a), anticorpos pré-formados, ou proteínas de fase aguda (como a Proteína C Reativa). A doença é em parte dependente de um balanço entre a proteção da imunidade e da imunopatologia. O objetivo geral deste estudo prende-se na análise do perfil de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com clínica suspeita de malária.

Material e Métodos

Foram utilizados 118 soros de pacientes adultos com clínica suspeita de malária potencialmente expostos a *P. falciparum*. Como controlo negativo utilizaram-se 14 soros de indivíduos portugueses saudáveis que nunca estiveram em regiões endémicas de malária. Através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) distinguiu-se a população com e sem reatividade serológica a anticorpos anti-*P.falciparum*, frente a um grupo controlo (soros de pacientes saudáveis de Portugal, que nunca estiveram em zonas endémicas para malária). Através do método ELISA procedeu-se à determinação dos níveis de anticorpos totais anti-*Plasmodium falciparum* IgG, IgM, IgG1, IgG3 e IgG4 e à concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias C5a do sistema complemento, proteína C reativa (CRP) e IFN- γ .

Resultados

Pela caracterização socio-demográfica da população estudada observou-se uma mediana de idades de 30 anos, com um predomínio do sexo masculino (67,8%). As viagens feitas pelos pacientes foram maioritariamente para o continente africano, com maior ênfase para Angola (50,0%). Das cento e trinta e duas amostras estudadas, sessenta e cinco foram classificadas como positivas para *Plasmodium* spp. As principais manifestações clínicas foram de febre, cefaleia e mialgias. Apenas quarenta amostras foram classificadas como serologicamente reativas para *P. falciparum*. Neste grupo de doentes observou-se um aumento dos mediadores inflamatórios, nomeadamente C5a, CRP e IFN- γ , bem como a presença de anticorpos do tipo IgG1, IgG3, e IgM anti-*P. falciparum*.

Conclusões

Pretendeu-se com este estudo contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da malária importada. Conseguiu-se estabelecer uma relação entre as citocinas pró-inflamatórias estudadas (C5a, CRP e IFN- γ) e os perfis de anticorpos anti-*P. falciparum* nestes pacientes.

Alteração do perfil lipídico em pacientes com esquizofrenia

PAULA OLIVEIRA¹, MARIA SOUSA^{1,2}, STÉPHANIE FERREIRA^{1,2},
ANABELA MOREIRA^{1,2}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto –
Instituto Politécnico do Porto

² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA),
ESTSP-IPP

Introdução

A esquizofrenia (SCZ) é uma patologia que envolve uma série de disfunções fisiológicas, cognitivas e emocionais. A terapêutica farmacológica evoluiu nas últimas décadas, sendo prescritos atualmente a estes pacientes antipsicóticos que têm permitido a sua melhor integração na comunidade. No entanto, os antipsicóticos apresentam efeitos colaterais, como alterações no metabolismo da glicose e dos lípidos que, por sua vez, aumentam o risco de síndrome metabólica (SM) e de doenças cardiovasculares nestes pacientes.

Objetivos

Esta revisão bibliográfica pretende sistematizar informação relevante sobre os distúrbios metabólicos, especificamente a dislipidemia, presentes nos pacientes com SCZ, percebendo quais os mecanismos subjacentes e suas causas.

Material e Métodos

A pesquisa de informação foi efetuada nos motores de busca *PubMed* e *Web of Science*. Selecionaram-se estudos de meta-análise e revisão sistemática,

ensaios clínicos e estudos observacionais analíticos, publicados desde 2004.

Resultados

Nos estudos selecionados, a prevalência da SM em pacientes com SCZ variou entre 3,9% e 49,6%, com predomínio de resultados próximos de 40%. O estudo com prevalência mais baixa comparou 51 pacientes com SCZ sem tratamento com antipsicóticos e 51 controlos saudáveis. Num estudo transversal a 1452 pacientes com uma duração média da SCZ de 15,5 anos, a SM estava presente em 24,6% da amostra (23,6% nos homens e 27,2% nas mulheres). Os estudos globalmente apontam como justificação para estes resultados entre os pacientes SCZ o estilo de vida não saudável, com dieta pobre em fibra e rica em teor de gordura e menor prática diária de exercício físico, em comparação com a população em geral. Adicionalmente, vários estudos apresentam resultados que consistentemente relacionam o desenvolvimento de dislipidemias com o tratamento com antipsicóticos, independentemente do agente antipsicótico utilizado, a duração do tratamento, dose e terapia antipsicótica múltipla e adjuvante. A clozapina e a olanzapina são os antipsicóticos com piores efeitos na dislipidemia, mostrando maior aumento dos triglicerídeos e do colesterol LDL, e diminuição do HDL.

Conclusões

A literatura evidencia alterações metabólicas nos pacientes com SCZ com impacto no risco cardiovascular. A sua dimensão e relevância apontam para a necessidade de estudos prospetivos controlados que permitam aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos farmacológicos subjacentes aos efeitos metabólicos dos antipsicóticos e compreensão dos fatores intrínsecos à SCZ que poderão ter expressão em alteração metabólica.

COMUNICAÇÕES PÓSTER

Desenvolvimento de métodos serológicos para diagnóstico de giardiose usando uma proteína recombinante β -giardina de *Giardia lamblia*

PEDRO HENRIQUES¹, ANDRÉ ALMEIDA^{1,2}, MARIA LURDES DELGADO¹, ANTÓNIA CONCEIÇÃO^{2,3}, JOSE MANUEL COSTA^{1,2}, ANTONIO CASTRO^{1,2}

¹Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

²ICETA-CECA, Centro de Estudos em Ciência Animal

³Escola Superior Agrária de Coimbra

Introdução

Giardia lamblia (sin. *Giardia intestinalis*; *Giardia duodenalis*) é um microrganismo eucariótico unicelular flagelado que vive como parasita gastrointestinal, infectando um elevado número de vertebrados incluindo o homem e animais domésticos. As giardinas são definidas como uma família de proteínas estruturais que podem variar entre 29-38 kDa e têm uma estrutura em hélice. As proteínas são encontradas nos ovos, no disco ventral do trofozoíto, tendo sido identificados vários genes de giardinas, incluindo a β -giardina.

Material e métodos

Após clonada a sequência completa do gene de β -giardina de *Giardia lamblia* (850 pb, n.º acesso GenBank X85985), codificando uma proteína de 33 kDa, produziu-se e isolou-se a respectiva proteína recombinante. Procedeu-se à avaliação da presença de anticorpos específicos em ovinos e bovinos por Immunoblotting. Procedeu-se igualmente à avaliação da presença de anticorpos específicos anti- β -giardina pelas técnicas de ELISA e DotBlot

Resultados e conclusões

O Immunoblotting mostrou a presença de anticorpos anti- β -giardina nos soros de ovinos e bovinos de explorações nacionais. Foram testadas várias condições para implementar a técnica de ELISA usando a β -giardina. Os resultados obtidos não permitiram detectar anticorpos específicos. De

seguida desenvolveu-se a técnica de DotBlot obtendo-se resultados concordantes com o Immunoblotting. Esta técnica de DotBlot permite um diagnóstico serológico de fácil execução e económico para a giardiose.

Espondilite Anquilosante: Alterações nos perfis lipídico e inflamatório

NÁDIA VALÉRIO¹ MARIA MANUELA AMORIM^{1,2}, STÉPHANIE LOPES FERREIRA^{1,2}, SANDRA MARLENE MOTA^{1,2}, TERESA MOREIRA^{1,2}, ANABELA MOREIRA^{1,2}

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente – ESTSP-IPP

Introdução

A Espondilite Anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crónica que acomete principalmente as articulações sacroilíacas, com consequente limitação da mobilidade. Vários estudos observaram que os doentes com EA apresentam alterações séricas do perfil lipídico, nomeadamente um aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e uma diminuição de lipoproteínas de alta densidade (HDL), em relação à população geral. Adicionalmente, como a EA é uma doença imunológica associada a um carácter inflamatório, os doentes com EA apresentam, geralmente, um perfil inflamatório alterado. Os perfis lipídico e inflamatório aterogénicos podem traduzir-se num risco aumentado de doenças cardiovasculares (DCV).

Objetivos

Sistematizar informação sobre a alteração dos perfis lipídico e de inflamação em pacientes com Espondilite Anquilosante, associados ao risco de DCV.

Material e Métodos

Realizou-se uma revisão bibliográfica, através da pesquisa de artigos científicos na *PubMed* e *Web of Knowledge* pelos descritores *Ankylosing Spondylitis*, *Inflammation*, *Inflammation Mediators*, *Lipid Metabo-*

COMUNICAÇÕES PÓSTER

lism, *Cardiovascular Disease* e *Atherosclerosis*. Foram incluídos artigos com data de publicação posterior a 2005.

Resultados

Os estudos selecionados apresentam resultados divergentes quanto à prevalência de alterações no perfil lipídico dos doentes com EA, contudo evidenciam uma associação entre a dislipidemia e o perfil pró-inflamatório. Relativamente aos marcadores da inflamação, a maioria dos estudos aponta uma elevação da Proteína Sérica Reativa (PCR), resultante do estado inflamatório crónico da EA e fator de risco independente para o desenvolvimento de aterosclerose. O risco de DCV nos doentes com EA é 1,6 a 1,9 vezes superior ao da população geral.

Conclusão

Embora não se possa concluir quanto à influência do perfil lipídico, os doentes com EA apresentam maior risco de DCV, possivelmente devido ao estado pró-inflamatório crónico. Assim, torna-se necessário a realização de estudos longitudinais e controlados, com maior amostragem, para a melhor compreensão deste processo fisiopatológico.

Métodos complementares de diagnóstico laboratorial da Leucemia Promielocítica Aguda

BARBOSA A, SANTOS C, OLIVEIRA J, LOPES M, AMORIM ML, SOARES MJ, GOMES MP

Centro Hospitalar São João, EPE

Introdução

A Leucemia Promielocítica Aguda, também denominada LAM-M3, apresenta características morfológicas específicas – promielócitos hipergranulares em percentagem anormal, bem como uma positividade intensa pela coloração citoquímica Sudão Negro. Geneticamente, esta patologia caracteriza-se pela translocação entre o cromossoma 15 (banda q24) e

o cromossoma 17 (banda q21), resultando no gene de fusão PML-RARA. A Citogenética convencional, hibridação por sondas de fluorescência “in situ” (FISH) e reação em cadeia de polimerase (PCR), são técnicas capazes de detectar a t(15,17) e respectivo gene de fusão. Cada uma delas, com vantagens e desvantagens que se complementam, não só em termos de diagnóstico, como na avaliação da resposta terapêutica e monitorização da doença.

Objetivos

Descrever os vários métodos complementares de diagnóstico da LAM-M3 no Laboratório de Hematologia Clínica.

Material e Métodos

Aspirado de medula óssea de doentes com suspeita de LAM-M3. Citogenética Convencional: Realização de culturas de 24h, com e sem sincronização por metotrexato (MTX), utilizando RPMI 1640 (1x) + GlutaMax como meio de cultura. Coloração de lâminas por Leishman. Software do cariotipador ASI®. FISH: Utilização da sonda Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe ABBOT-Molecular, de acordo com as indicações do fabricante. Núcleos analisados ao microscópio de fluorescência e registo das imagens no Programa Cytovision®. Biologia Molecular: Extração de RNA seguida de Reverse Transcriptase-PCR, protocolo de acordo com European Against Cancer, para os diferentes transcritos de fusão PML-RARA. Hematologia Clínica: Coloração dos esfregaços de medula óssea por Wright e Sudão Negro e observação ao microscópio óptico.

Resultados

Citogenética Clássica: Observa-se a t(15,17). FISH: Observam-se os dois derivados da t(15,17) assim como uma cópia normal do gene PML e uma cópia normal do gene RARA. Biologia Molecular: Detecção de um dos transcritos de fusão (BCR1, BCR3 e BCR2 em menor número). Hematologia Clínica: A medula óssea apresenta promielócitos

COMUNICAÇÕES PÓSTER

hipergranulares anormais bem como corpos de Auer. Os promielócitos são intensamente positivos quando corados pelo Sudão Negro.

Conclusão

Na LAM-M3 o diagnóstico laboratorial rápido é crítico para a instituição da terapêutica adequada. Assim, o Laboratório de Hematologia Clínica com todas as suas áreas é um poderoso aliado para o diagnóstico, seguimento e tratamento desta e de outras patologias hematológicas.

Malária e Dádiva de Sangue: Comparação de critérios clínicos e serológicos na seleção de potenciais dadores de sangue com estadias em zona endémica

DANIELA PORTUGAL-CALISTO, MARCELO SOUSA SILVA, ANA
FERREIRA, ROSA TEODÓSIO

Unidade de Ensino e Investigação de Clínica Tropical,
Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e
Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

Introdução

Estudos sobre a resposta imune humoral à malária mostraram anticorpos anti-*Plasmodium* spp. em circulação, em população assintomática, vários anos após saída de zona endémica. Um residente/visitante em zona endémica de malária poderá dar sangue 1-3 anos após o regresso se assintomático (critério clínico) ou após 4 meses se teste serológico negativo (critério serológico) (DL 267/2007 de 24 de Julho).

Objectivos

Comparar taxas de aprovação de potenciais dadores de sangue utilizando critérios clínicos ou serológicos.

Materiais e Métodos

Participaram 377 indivíduos, idade 18-65 anos, assintomáticos, com estadias prévias em zona

endémica de malária, com ou sem história da doença. Estudou-se a reatividade serológica anti-*Plasmodium* spp. em amostras de plasma utilizando o teste imunoenzimático MALARIA EIA TEST KIT (BioRad®, USA). Compararam-se taxas de aceitação/suspensão de potenciais dadores de sangue com a utilização de cada tipo de critérios.

Resultados

Grupo de indivíduos que viveram em zona de malária durante os cinco primeiros anos de vida (n=65): 23,1% (15/65) regressaram há menos de 4 meses, não sendo aprovados para a dádiva de sangue. Critério serológico: 75% (9/12) dos indivíduos regressados de zona endémica entre 4 meses a 3 anos antes do estudo apresentam resultado serológico negativo (13,8% (9/65) de aprovação neste grupo); critério clínico: aprovados 58,5% (38/65) de indivíduos, por terem permanecido 3 ou mais anos fora de zona endémica. No entanto, 15,4% de indivíduos (10/65) com estadia fora de zona endémica há mais de 3 anos apresentaram resultado serológico positivo. *Grupo dos visitantes assintomáticos de zonas endémicas (indivíduos com estadia em zona endémica inferior a 1 ano) (n=177):* 25% (45/177) regressaram há menos de 4 meses, não sendo aprovados para a dádiva. Critério serológico: Todos os indivíduos regressados de zona endémica entre 4 meses a 1 ano tiveram resultado serológico negativo (22/22) (12,4% (22/177) de aprovação neste grupo); critério clínico: aprovados 62,1% (110/177) de indivíduos, por terem permanecido 1 ano fora de zona endémica. Contudo, 0,6% (1/177) dos indivíduos com regresso de zona endémica há mais de 1 ano apresentaram resultado serológico positivo.

Conclusões

Os resultados sugerem que o uso de critérios serológicos, em detrimento dos critérios clínicos, iria permitir a aprovação de maior número de dádivas de sangue. Não obstante, o critério clínico usado isoladamente parece acarretar maior risco de transmissão do parasita, uma vez que a triagem baseada apenas neste critério permitiria a dádiva a

indivíduos com resultado serológico positivo, pondo em causa, eventualmente, a segurança transfusional. Assim, a realização de testes serológicos mostra-se imperativa em indivíduos com estadias prévias em zonas endémicas de malária. Sugerem-se novos estudos para caracterizar melhor o tipo de anticorpos detetados.

Avanços Tecnológicos em Hematologia Laboratorial **Sysmex® XN9000™ Series**

CARDOSO S, CLEMENTE S, FARIA C, GONÇALO A, SERRA C, MENDES C

Serviço de Hematologia Laboratorial, Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE

A automatização na área da Hematologia Laboratorial tem permitido uma otimização do fluxo de trabalho, a rastreabilidade de cada amostra desde a sua receção até ao seu armazenamento, bem como uma diminuição no tempo de resposta analítica (300 amostras/hora). A introdução deste novo sistema modular da Sysmex® (XN9000™) tem contribuído para um avanço tecnológico nesta área, quer pela apresentação de novas metodologias, quer pela determinação de parâmetros hematológicos que permitem avaliar e monitorizar a hematopoiese. Apresentam-se como características inovadoras deste sistema, a análise reflexa automática das amostras, tendo por base os resultados obtidos, assim como a diminuição do volume necessário para o processamento da amostra e a presença de um perfil de análise de líquidos biológicos.

O Sysmex® XN9000™ é constituído por cinco canais de análise, que têm por base a metodologia de citometria de fluxo, utilizando a marcação por fluorescência dos ácidos nucleicos para a diferenciação de leucócitos. O canal de precursores de leucócitos (**WNR**) inclui uma contagem de eritroblastos em todas as amostras de modo a minimizar a sua interferência na contagem dos

leucócitos. O canal do diferencial leucocitário (**WDF**) efectua a contagem de basófilos, otimiza a diferenciação de linfócitos e monócitos e permite a identificação de granulócitos imaturos. O canal de reticulócitos (**RET**) fornece parâmetros fundamentais no estudo da eritropoiese e na monitorização do metabolismo do Ferro (conteúdo da hemoglobina nos reticulócitos - Ret-He e fração de reticulócitos imaturos - IRF). O canal de plaquetas fluorescentes (**PLT-F**) permite avaliar a trombopoiese e confirmar o número de plaquetas perante contagens baixas ou alterações no respectivo histograma, alterações possivelmente desencadeadas pela agregação plaquetária, presença de fragmentos leucocitários e eritrocitários e microcitose. Por último, o canal dos precursores dos leucócitos (**WPC**) é utilizado na análise reflexa de amostras com suspeita da presença de blastos ou linfócitos atípicos, permitindo assim a sua distinção.

Para além da metodologia de citometria de fluxo, o Sysmex® XN9000™ utiliza a metodologia de impedância (corrente direta) na contagem de eritrócitos e plaquetas e o mecanismo de reação do método Hemoglobina-Sulfato Lauril de Sódio (HGB-SLS) na determinação da concentração de hemoglobina.

O perfil de líquidos biológicos realiza as contagens de leucócitos (polimorfonucleares – PMN e mononucleares - MNC) e eritrócitos. Apresenta também, um histograma que permite detetar células de elevada fluorescência, bem como diferenciar as células mononucleares (linfócitos e monócitos).

Estudo do tubo S-Monovette® GlucoEXACT/3,1 mL

LEITE, DANIELA¹; ROCHA, ANDREIA¹; LOBO, EUGÉNIA¹

¹*Serviço Patologia Clínica, C. H. entre Douro e Vouga*

Introdução

A glicose é um carbohidrato utilizado pelas células como fonte de energia e intermediário metabólico. O

COMUNICAÇÕES PÓSTER

doseamento da glicose permite diagnosticar estados de hiperglicemia ou de hipoglicemia causados por anomalias de hormonas produzidas pelo pâncreas. A causa mais frequente de hiperglicemia é a Diabetes *Mellitus*. A concentração da glicose no sangue da população de referência varia entre 70 a 100 mg/dl. A glicólise diminui a glicose sérica em aproximadamente 5 a 7% numa hora (5 a 10 mg/dl) num tubo de sangue total, não centrifugado e à temperatura ambiente (TA). Em amostras centrifugadas, estéreis, não hemolisadas, a concentração da glicose mantém-se estável durante 8 horas a 25°C e 72 horas a 4°C. O tubo S-Monovette GlucoEXACT é adequado para a determinação da concentração de glicose no plasma pelo método da hexoquinase. A mistura de citrato presente no tubo com a glicose, proporciona a inibição imediata e duradoura da glicólise (DDG/DGGG).

Objetivo

Neste estudo pretende-se efetuar a validação do tubo S-Monovette GlucoEXACT para a determinação da glicose de modo a eliminar o erro da fase pré-analítica. Para isso efetuou-se o estudo comparativo da estabilidade da glicose nos tubos GlucoEXACT/3,1 ml versus tubos de bioquímica Serum Gel Z/7.5 ou 2.6 ml.

Material e Métodos

No período de uma semana de Dezembro de 2014 foram efetuadas colheitas de sangue venoso simultâneas em tubo sem aditivo, com gel de separação, e em tubo S-Monovette GlucoEXACT, sendo doseadas 89 amostras em tempos diferentes. As amostras foram doseadas por método ótico no ARCHITECT c8000, da Abbott®. Para recolha dos dados utilizou-se o Appolo® (SIL) e para a descrição estatística da nossa amostra o software Excel® e SPSS versão 19.0®.

Resultados

As 89 amostras sujeitas a doseamento seriado da glicose eram de doentes da Consulta Externa, sendo

35 do sexo masculino e 54 do feminino, com idades compreendidas entre os 7 e 87 anos. 44% tiveram origem na Medicina Interna e suas subespecialidades, 19% na Ortopedia, 10% na Cirurgia Geral e o restante de outras especialidades. Na Avaliação do tubo S-Monovette GlucoEXACT/3,1 ml: O valor da estatística do teste *t-student* foi de 27,6 para os dois tubos no tempo 0h; 26,1 para o tempo 4h; 18,5 para o tempo 8h e 18,8 para o tempo 24h. Neste exemplo, como o teste é unilateral, para um nível de confiança de 95%, o valor de *t* deve ser 1,990. Assim para os tempos 0, 4, 8 e 24 horas o *p-value* é superior a 1,990 pelo que não se aceita a hipótese nula.

Conclusão

O tubo S-Monovette® GlucoEXACT está em conformidade com as diretrizes alemãs, estabilizando diretamente a concentração de glicose de uma amostra de sangue até às 48 horas à TA. Com o nosso estudo comparativo utilizando testes emparelhados e o *t-student* verificamos existir diferenças significativas entre as médias, que provam que no tubo S-Monovette® GlucoEXACT a glicose mantém-se estável no tempo entre a colheita e a sua determinação.

Laboratory Diagnosis of Hodgkin Lymphoma

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco (Portugal)

²Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã (Portugal)

Introduction

Hodgkin Lymphoma (HL) is a lymphoid neoplasm derived, in most cases, from B-cells. It affects predominantly the lymph nodes and lymphatic systems. It is characterized by the presence of large and characteristic multi and mononuclear leukemic cells: Reed-Sternberg and Hodgkin cells.

COMUNICAÇÕES PÓSTER

Objective

Characterize the laboratory diagnosis of HL

Results and Conclusion

HL laboratory diagnosis depends essentially on the histological analysis of the lymph nodes. Immunohistochemistry, although recommended, is not necessary to diagnosis. Also, initial laboratory studies should include the complete blood count, erythrocyte sedimentation rate, as well as biochemical and serological markers's study.

Laboratory Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹*Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco (Portugal)*

²*Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã (Portugal)*

Introduction

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. It is characterized by the proliferation of immature lymphoid cells in the bone marrow, peripheral blood and other organs.

Objective

Characterize the laboratory diagnosis of ALL

Results and Conclusion

We observed that initial ALL laboratory studies should include the complete blood count and the blood smear. Also, we concluded that ALL diagnosis depends essentially on the bone marrow analysis, flow cytometry immunophenotyping and cytogenetic analysis.

Laboratory Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia

ADRIANA SOUSA^{1,2}, MARISA BARBEIRA¹

¹*Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco (Portugal)*

²*Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã (Portugal)*

Introduction

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most frequent lymphoid leukemia. It is a malignant hematologic disease characterized by the accumulation of small mature lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow and lymphoid tissues.

Objective

Characterize the laboratory diagnosis of CLL.

Results and Conclusion

CLL diagnosis relies essentially on the results of the complete blood count and observation of the blood smear, and it is confirmed by flow cytometry immunophenotyping. These results are complemented by cytogenetic analysis.

AGENDA DE EVENTOS

Curso Pós-Graduação Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo 2015.

13 a 15 de maio de 2015, Tryp Lisboa Aeroporto Hotel

[*www.cognicao.pt/cursoHEiD/*](http://www.cognicao.pt/cursoHEiD/)

4ª Reunião de Imunoalergologia

22 maio 2015, Hotel Vip Executive Arts

[*reuniao.imunoalergo.hde.2015@gmail.com*](mailto:reuniao.imunoalergo.hde.2015@gmail.com)

European Hematology Association Annual Congress

11/06/2015 - 14/06/2015, Vienna, Austria

[*www.eventegg.com/eha-2015/*](http://www.eventegg.com/eha-2015/)

IBMS Biomedical Science Congress.

28-30 Sept 2015. Birmingham – UK

[*www.ibms.org/congress/*](http://www.ibms.org/congress/)

IX Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Imuno-Hemoterapia.

8-9 outubro. Viseu

[*www.skyros-congressos.pt/apih2015/*](http://www.skyros-congressos.pt/apih2015/)

LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia

XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia.

Valência, 22 a 24 de Outubro de 2015

[*http://2015.sehhseth.com*](http://2015.sehhseth.com)

Reunião Anual Sociedade Portuguesa de Hematologia 2015

12/11/2015 - 14/11/2015, Eurostars Oasis Plaza Hotel, Figueira da Foz

[*www.sph.org.pt*](http://www.sph.org.pt)

SPBS

Sociedade Portuguesa de Bioanalistas Clínicos

Ficha de inscrição SÓCIOS

Podem ser admitidos como membros (sócios) da SPBS todos os Profissionais de Análises Clínicas e Saúde Pública (BioAnalistas / Biomédicos Laboratoriais), diplomados por uma Escola Superior ou Universidade reconhecida pela SPBS. A condição de sócio só se torna efetiva após o pagamento da quota de inscrição, o que confere descontos em atividades da SPBS e o direito de receber as publicações da sociedade. A SPBS tem como principais objetivos a promoção da Profissão, a formação contínua e o apoio à Investigação Científica.

Nome: _____

Morada completa: _____

Localidade: _____ C. Postal: |_|_|_|_|-|_|_|_|_| _____

[illegible]

Profissão: _____

Instituição: _____

Serviço/Departamento: _____

Morada: _____ Tel.: | | | | | | | | | |

*E-mail: _____

***Preenchimento obrigatório.** Dado que todas as publicações (Revista Bioanálise), notificações e informações resultantes do normal funcionamento dos Órgãos Sociais da SPBS serão efetuadas por via digital para o e-mail do sócio, é fundamental manter o endereço de e-mail atualizado.

REGIME ANUAL DE QUOTAS

☐ Sócio Titular – 20€ ☐ Sócio Estudante (curso base – carece do envio de comprovativo) – Isenção de quotas

☐ Usufruo de uma campanha especial: _____

A quota anual pode ser liquidada por débito direto, cheque ou numerário.

Data: ____/____/____ Assinatura: _____

Enviar para: Sociedade Portuguesa de Bioanalistas Clínicos – Ap. 2009 – 3501-909 Viseu

E-mail: spbsgeral@gmail.com • Telem.: 966 931 470



SPBS

Sociedade Portuguesa
de Bioanalistas Clínicos

AUTORIZAÇÃO DE DÉBITO DIRETO

Identificação do Credor					
-------------------------	--	--	--	--	--

[illegible]

Eu, _____, autorizo que por débito direto da minha/nossa conta abaixo indicada procedam ao pagamento das importâncias apresentadas pela Sociedade Portuguesa de Bioanalistas Clínicos (SPBS).

NIB: | | | | | | | | | | | | | | | | Banco: _____

Data: ____/____/____ Assinatura: _____

Responsabilidade de Autoria e Transferência de Direitos de Autor

Checklist para Autores

Título do Artigo: _____

Categoria do Artigo: _____

Autor correspondente: _____

***Assinalar com (x) as questões que se aplicam ao artigo**

☐	Este artigo ou parte dele não foi publicado ou submetido a outra publicação.
☐	Todos os autores contribuíram significativamente para o desenho do estudo e execução do trabalho descrito.
☐	Todos os autores leram e concordaram com a versão final submetida.
☐	O estudo foi aprovado por comissões de ética e está de acordo com o Declaração de Helsínquia.
☐	Todas as pessoas que contribuíram substancialmente para este trabalho mas que não preenchem a categoria de autor concordaram com a sua nomeação nos agradecimentos, tendo sido obtida a sua permissão escrita.
☐	São transferidos para a SPBS todos os direitos de autor, caso o artigo seja publicado.
☐	Os autores não têm qualquer filiação ou envolvimento financeiro em qualquer organização ou entidade com interesse financeiro no tema ou resultados discutidos no artigo.
☐	O apoio financeiro para esta investigação está referenciado no artigo.
☐	Legendas de figuras encontram-se no fim do texto.
☐	Quadros, figuras e tabelas estão numerados e apresentados separadamente do texto.
☐	Todas as unidades de medida estão expressas em unidades SI.

Assinaturas dos Autores

Data

Pode fotocopiar-se esta ficha.



XII CONGRESSO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

PORTO

Auditório Universidade
Fernando Pessoa

**18 ABRIL
2015**

APOIOS

SIEMENS



enzifarma



oportunity
to invest



Capricho DOCE
CONFEITARIA PÃO QUENTE