



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Catarina Filipa Gonçalves Frederico

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e Dra. Alice Mendes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2019



Catarina Filipa Gonçalves Frederico

## **Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas**

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,  
orientado pela Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e Dra. Alice Mendes  
e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2019

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por me ter dado a oportunidade de integrar e realizar este estágio num laboratório tão imenso quanto este.

Um obrigada muito especial à Dra. Alice Mendes e Dra. Cristiana Canha, pela ajuda integração no laboratório, pela revisão deste trabalho, disponibilidade, prontidão, preocupação e conhecimento transmitido ao longo do período de estágio.

À Professora Doutora Gabriela Silva pela amabilidade, sugestões, incentivo, disponibilidade prestada e ajuda preciosa nas correções deste relatório de estágio.

À Dra. Cristiana Lopes por toda a disponibilidade prestada sobretudo no desenvolvimento do caso clínico!

A todas as pessoas do Serviço de Patologia Clínica que se cruzaram no meu caminho, e que de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento pessoal e académico.

À Ana Sofia por ser das melhores pessoas que este Mestrado me trouxe. Um obrigada enorme por todas as conversas, revisões pré-exames, parvoíces e cafés ao longo destes 2 anos!

Ao André, um grande obrigada por estar sempre do meu lado tanto nos bons como nos maus momentos, pela paciência e carinho.

Aos meus pais e irmão um obrigada do fundo do coração por todo o incentivo, apoio incondicional, amor, carinho e compreensão. Obrigada mãe e pai por todas as oportunidades que me proporcionaram no meu percurso académico, paciência e incentivo diário. Obrigada “mano” por todos os conselhos e ajuda que me dêste, mas sobretudo por seres o melhor irmão que podia pedir.



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Caracterização do laboratório</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Controlo de qualidade</b> .....	<b>3</b>
3.1 Controlo de Qualidade Interno.....	3
3.2 Controlo de Qualidade Externo.....	3
<b>4. Imunologia</b> .....	<b>4</b>
4.1 Laboratório de Imunologia.....	4
4.1.1 Parâmetros imunoquímicos.....	5
4.1.2 Eletroforese das proteínas séricas.....	5
i. Frações normais das proteínas do soro.....	6
ii. Padrão eletroforético de doença hepática.....	9
iii. Padrão eletroforético de doença renal.....	10
iv. Detecção de proteínas monoclonais no soro.....	10
4.1.3 Eletroforese das proteínas urinárias.....	12
i. Proteinúria glomerular e proteinúria tubular.....	13
ii. Proteinúria Bence Jones.....	13
4.1.4 Imunofixação.....	14
i. Imunofixação sérica.....	14
ii. Imunofixação urinária.....	15
4.1.5 Pesquisa de crioglobulinas.....	15
4.1.6 Determinação de IgE específica.....	16
4.2 Laboratório de Autoimunidade.....	18
4.2.1 Doenças autoimunes.....	18
4.2.2 Imunofluorescência Indireta (IFI).....	19
i. Anticorpos anti-nucleares (ANAs) e anti-citoplasmáticos.....	20
ii. Anticorpos anti-dsDNA.....	23
iii. Mosaico hepático.....	24
a) Anticorpos anti-nucleares (ANA).....	24
b) Anticorpos anti-músculo liso (ASMA).....	25
c) Anticorpos anti-LKM1.....	25
d) Anticorpos anti-mitocôndrias (AMA).....	25
e) Anticorpos anti-células parietais gástricas (APCA).....	26
iv. Mosaico Granulócitos.....	26
4.2.3 Radioimunoensaios (RIA).....	27
4.2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	28

4.2.5 Quimioluminescência .....	28
<b>5. Microbiologia .....</b>	<b>29</b>
5.1 Bacteriologia .....	30
5.1.1 Amostras biológicas .....	30
i. Urina (uroculturas) .....	30
ii. Sangue (hemoculturas) .....	32
iii. Pontas de cateter .....	34
iv. Exsudatos vaginais .....	34
v. Exsudatos oculares .....	35
vi. Líquido Cefalorraquidiano (LCR) .....	35
vii. Líquido sinovial, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido pericárdico .....	36
viii. Exsudatos de feridas e pus de abscessos .....	37
ix. Amostras do trato respiratório .....	37
x. Biópsias .....	38
xi. Fezes .....	39
5.1.2 Identificação .....	40
5.1.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	41
5.2 Micobactérias .....	43
5.2.1 Identificação de micobactérias .....	44
5.2.2 Teste de suscetibilidade aos antibacilares .....	45
5.3 Virologia .....	46
5.4 Parasitologia .....	48
5.5 Micologia .....	49
5.6 Serologia .....	50
<b>6. Bioquímica Clínica .....</b>	<b>51</b>
<b>7. Hematologia .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Interpretação laboratorial de um caso clínico .....</b>	<b>54</b>
<b>9. Conclusão .....</b>	<b>59</b>
<b>10. Bibliografia .....</b>	<b>61</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>67</b>



## Lista de abreviaturas

ABEI	Aminobutilisoluminol
AgHBe	Antigénio de superfície
AgHBs	Antigénio solúvel
AMA	Anticorpos anti-mitocôndrias
AMA-M2	Anticorpos anti-complexo piruvato desidrogenase
AMA-M2-3E	Anticorpos anti-subunidade E2 das a-2-oxoácido desidrogensases
ANA	Anticorpos anti-nucleares
ANCA	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
Anti-LKMI	Anticorpos anti-microsomas renais-hepáticos tipo I
APCA	Anticorpos anti-células parietais gástricas
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial ativado
ASMA	Anticorpos anti-músculo liso
BAAR	Bacilos ácido-álcool resistentes
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
BCSA	Meio seletivo para <i>Burkholderia cepacia</i>
BHI	Meio líquido <i>Brain-heart infusion</i>
<i>C.difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
cANCA	Padrão citoplasmático autoanticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
CB	Caldo de Bacilos Gram negativo
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CLED	Gelose Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos
CM	Meio <i>Cooked meat</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
CNA	Meio Columbia Ácido Naladíxico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
E	Etambutol
EDTA	Etilenodiamino Tetra-Acético
ENA7	Anticorpos anti-antigénios nucleares extraíveis
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>

FEIA	<i>Fluorescence enzyme immunoassay</i>
GS	Gelose de sangue
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H <sup>+</sup>	Iões de hidrogénio
HAE	Meio <i>Haemophilus</i>
Hep-2	Células Epiteliais Humanas do Tipo 2
HK	Meio Columbia com Hemina e Vitamina K
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
I	Isoniazida
I <sup>125</sup>	Iodo <sup>125</sup>
IA2	Anticorpos anti-tirosina fosfatase
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina(s)
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ITU	Infeções do trato urinário
κ	cadeias leves κ
λ	cadeias leves λ
LCR	Líquido(s) cefalorraquidiano(s)
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i>
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MGUS	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
MH	Meio Muller-Hinton
MPO	Mieloperoxidase
NALC	N-acetil-L-cisteína
NaOH	Hidróxido de sódio
NEISS	Meio Neisseria
NEQAS	<i>National External Quality Assessment Schemes</i>
PAMPs	Padrões moleculares conservados associados aos agentes patogénicos
pANCA	Padrão perinuclear autoanticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PR3	Proteínase 3
PT	Tempo de Protrombina
PVX	Meio chocolate PolyVitex
PZA	Pirazinamida
QFA	Quantificação de Fibrinogénio
R	Rifampicina
RIQAS	<i>Randox International Quality Assessement Schemes</i>
RLUs	Unidade de Luz Relativa
S	Estreptomicina
<i>S.agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SaCI	Meio Sabouraud com cloranfenicol
Schaedler-KV	Meio Kanamicina-Vancomicina com 5% sangue de ovelha
SNC	Sistema nervoso central
SS	Salmonella Shigella agar
TB	Tuberculose
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TSA	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
UFCs	Unidades formadoras de colónias
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VSM47	<i>Vascular smooth muscle cell line</i>



## Lista de Figuras

Figura 1 – Eletroforese capilar de um soro normal.....	6
Figura 2 – Padrão eletroforético característico de cirrose.....	9
Figura 3 – Eletroforese das proteínas sérias com presença de pico monoclonal.....	11
Figura 4 – Ilustração representativa do padrão de migração das proteínas urinárias.....	12
Figura 5 – Padrões de fluorescência nuclear em células Hep-2.....	22
Figura 6 – Padrões de fluorescência citoplasmáticos em células Hep-2.....	23
Figura 7 – Padrões de fluorescência na <i>Crithidia luciliae</i> .....	23
Figura 8 – Padrões de fluorescência dos ANCA por IFI.....	27
Figura 9 – Técnica utilizada para a inoculação de urina.....	31
Figura 10 – Técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido, para obtenção de colônias isoladas.....	33
Figura 11 – Metodologias utilizadas nos antibiogramas.....	42
Figura 12 – Aspeto macroscópico de algumas micobactérias no meio sólido Löwenstein-Jensen.....	44

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros imunoquímicos determinados no laboratório de imunologia e respectiva metodologia utilizada. ....	5
Tabela 2 – Classificação de crioglobulinas de acordo com o sistema Brouet.....	16
Tabela 3 – Padrões nucleares mais comuns, com os respectivos antigénios associados e correlação clínica.....	21
Tabela 4 – Padrões citoplasmáticos mais comuns, com os respectivos antigénios associados e correlação clínica.....	22
Tabela 5 – Critérios de avaliação do crescimento microbiano nas uroculturas.....	32
Tabela 6 – Critérios de avaliação da qualidade das amostras de expetoração.....	38
Tabela 7 – Cartas de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizadas no VITEK 2 <sup>®</sup> .....	41
Tabela 8 – Anticorpos e/ou antigénios associados a infeções virais, pesquisados pela metodologia de quimioluminescência.....	48
Tabela 9 – Principais parâmetros bioquímicos determinados para avaliação das diferentes funções fisiológicas.....	52
Tabela 10 – Testes para avaliação da hemostase realizados mais frequentemente, respectiva metodologia e equipamento utilizado.....	53
Tabela 11 – Parâmetros realizados no sector de hematologia, resultados obtidos e respectivos valores de referência.....	55
Tabela 12 – Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos para Citomegalovírus e Epstein-Barr.....	56
Tabela 13 – Resultados obtidos na determinação das Cargas virais de Citomegalovírus e Epstein-Barr.....	56

## **Resumo**

O Laboratório de Análises Clínicas tem um papel fundamental no diagnóstico, monitorização e rastreio de patologias. Deste modo, a sua atividade constitui um meio complementar de diagnóstico essencial para a aferição do estado de saúde individual e ultimamente comunitário.

Este relatório foi desenvolvido no âmbito do estágio curricular integrado no Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) entre janeiro e junho de 2019 no serviço de Patologia Clínica. Neste relatório, serão descritas as atividades desenvolvidas ao longo do período de estágio, nas diversas áreas clínicas: Microbiologia, Bioquímica Clínica, Imunologia e Hematologia. De entre estas, serão aprofundadas as áreas de Microbiologia e Imunologia devido ao maior interesse pessoal desenvolvido durante o período curricular.

Durante o período do estágio tive a oportunidade de aplicar os meus conhecimentos teóricos adquiridos anteriormente no contexto real de um laboratório clínico o que efetivamente resultou numa robusta consolidação académica e formação profissional.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas; Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; Diagnóstico laboratorial; Microbiologia; Imunologia.





## **Abstract**

The Clinical Analysis Laboratory plays a key role in the diagnosis, monitoring and screening of pathologies. Thus, its activity represents an essential diagnostic tool for gauging the health of individuals and ultimately of the communities they integrate.

This report was written as part of the Masters of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of Coimbra University, which took place in Centro Hospitalar e Universitario de Coimbra (CHUC) between January and June 2019, in the unit of Clinical Pathology. The procedures described here have taken place during the internship period and encompass several clinical subjects, such as Microbiology, Clinical Biochemistry, Immunology and Haematology. The subjects of Microbiology and Immunology will be described in greater detail due to the higher level of personal enthusiasm and interest they have generated.

The internship period allowed me to apply the theoretical knowledge acquired beforehand within the context of a real-world Clinical Laboratory. This has effectively contributed for a consolidation of my academic competences and better preparation as a Clinical Laboratory professional.

**Keywords:** Clinical Analysis; Faculty of Pharmacy of Coimbra University; Laboratorial diagnosis; Microbiology; Immunology.



## **I. Introdução**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, registaram-se cerca de 56,9 milhões de mortes a nível mundial em 2016. No caso concreto de Portugal, dados do Instituto Nacional de Estatística revelam que no mesmo período, foram contabilizadas 110 970 mortes. Apesar de mais de metade destas mortes terem como causa doenças do aparelho circulatório e os tumores malignos, um vasto número de doenças aflige diariamente a população. O diagnóstico, monitorização e rastreio de patologias assumem assim um papel fundamental na manutenção e melhoria dos cuidados de saúde. Deste modo, não é certamente coincidência que, tal como nos anos anteriores, as Análises Clínicas e de Saúde Pública sejam a atividade com mais técnicos de diagnóstico e terapêutica, (21,5% do total, em comparação com 20,4% de meios radiológicos ou 15,6% de meios fisioterapêuticos). Estes números ilustram e realçam o papel crucial do laboratório de Análises Clínicas para um funcionamento eficaz do Serviço Nacional de Saúde.

Atualmente, os testes laboratoriais auxiliam a maioria das decisões clínicas, permitindo ao prestador dos cuidados de saúde a capacidade de orientar a terapêutica, originando uma medicina mais personalizada. Deste modo, é fundamental que se garanta a qualidade e fiabilidade nos resultados analíticos emitidos através da implementação de sistemas de controlo de qualidade. Assim sendo, o laboratório de análises clínicas desempenha cada vez mais um papel importante no sistema de saúde.

Todas as etapas da gestão laboratorial necessitam de ser tratadas com eficiência, qualidade e segurança desde o momento da receção da amostra, passando pelo seu processamento, até à emissão do seu resultado.

No serviço de Patologia Clínica do CHUC, onde tive a oportunidade de realizar o estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas, passei pelas várias áreas deste serviço (Bioquímica Clínica, Imunologia, Microbiologia e Hematologia), nas quais integrei e colaborei com as diferentes equipas, permitindo-me adquirir experiência prática e científica nas várias áreas.

Dos quatro sectores onde realizei o estágio, serão apenas abordados de um modo aprofundado as áreas de Imunologia e Microbiologia.

## 2. Caracterização do laboratório

O Serviço de Patologia Clínica do CHUC é constituído por três laboratórios: Laboratório no edifício São Jerónimo no Hospital Universitário de Coimbra, Laboratório do Hospital Pediátrico e Laboratório do Hospital Geral nos Covões. Este serviço tem como diretor clínico o Dr. Fernando Rodrigues e é constituído por uma equipa multidisciplinar de Médicos Patologistas Clínicos, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, Técnicos Administrativos e Técnicos Auxiliares de Saúde.

O laboratório principal situa-se no Edifício de São Jerónimo, sendo por isso o laboratório que recebe maior fluxo de amostras.

O laboratório principal é constituído por uma zona de receção de produtos, sala de colheitas, sala de espera, salas de trabalho dos diferentes sectores com as respetivas salas de validação de resultados, *Corelab*, salas de arrumação dos consumíveis do laboratório e salas de lavagem e esterilização do material.

Na sala de colheitas do laboratório, são realizadas mais de 300 colheitas por dia, de diversas amostras, sendo o sangue e urina as mais comuns. Os tubos ou contentores utilizados para as colheitas das amostras são devidamente identificados com um código de barras, que identifica o paciente. Para além das amostras colhidas na sala de colheitas, são recebidas amostras das diferentes enfermarias do CHUC, do serviço de urgência, do Hospital Pediátrico, do Hospital dos Covões, Maternidade Bissaya Barreto e Daniel de Matos, assim como de outros hospitais, como o Hospital de Castelo Branco, Hospital de Cantanhede e Hospital Tondela-Viseu. As amostras provenientes do exterior do CHUC são também triadas e integradas no sistema informático.

No laboratório existem quatro sectores major: Química Clínica, Hematologia, Microbiologia e Imunologia. A Química Clínica e a Hematologia estão inseridas no *Corelab*. O *Corelab*, é constituído por uma cadeia automatizada com diferentes equipamentos que permite a determinação de parâmetros bioquímicos (de urgência e de rotina), serológicos, hematológicos e alguns parâmetros imunológicos. A receção, integração e distribuição das amostras para os sectores os diferentes sectores é feita no *Corelab*.

O sistema informático utilizado no laboratório, o *Clinidata XXI*, permite integrar toda a informação clínica de cada paciente, ou seja, todos os pedidos de análise, visualização da história clínica do paciente a rastreabilidade das amostras, visualização estatística de parâmetros realizados/ por realizar, validação de resultados e ainda a produção de listas de trabalho.

No sector de Hematologia, no *Clinidata XXI*, está integrado um sistema de gestão específico deste sector, o *Hemagest*.

### **3. Controlo de qualidade**

#### **3.1 Controlo de Qualidade Interno**

O Controlo de Qualidade Interno (CQI) é um controlo intra-laboratorial, que consiste na análise diária de amostras controlo, ou seja, com valores analíticos conhecidos, com a finalidade de garantir a reprodutibilidade e a fiabilidade dos resultados obtidos. O CQI é efetuado antes das amostras serem processadas, com intuito de avaliar e validar as metodologias a serem utilizadas.

Existem três níveis distintos de controlos, o nível baixo, médio e alto. A avaliação do CQI é feita de acordo com os valores estabelecidos destes controlos nas respetivas bulas, sendo a sua interpretação feita através das cartas de Levey-Jennings, nas quais são aplicadas as regras de Westgard. Os resultados que se encontram dentro do intervalo de confiança ( $\pm 3$  desvios padrão) são validados, no entanto caso isto não aconteça devem ser rejeitadas as séries analíticas fora de controlo, identificar o erro e implementar ações corretivas (Burtis e Bruns, 2016).

#### **3.2 Controlo de Qualidade Externo**

O Controlo de Qualidade Externo (CQE) é um controlo inter-laboratorial que consiste na análise de amostras enviadas por entidades exteriores ao laboratório, cujos valores analíticos não são conhecidos.

Os parâmetros analíticos realizados são comparados com os de outros laboratórios participantes do mesmo grupo, ou seja, que utilizam as mesmas metodologias para aqueles ensaios. Deste modo, o CQE permite determinar a exatidão e avaliar a manutenção da precisão a longo prazo dos métodos analíticos utilizados no laboratório (Burtis e Bruns, 2016).

O laboratório do CHUC participa em vários programas de CQE, nomeadamente no *National External Quality Assessement Schemes (NEQAS)* e *Randox International Quality Assessement Schemes (RIQAS)*, entre outros.

## **4. Imunologia**

A imunologia é o estudo do sistema imunitário, sendo este um sistema complexo que tem como principal função a defesa do hospedeiro.

O sistema imunitário é constituído pelo sistema imunitário inato e pelo sistema imunitário adquirido. O sistema imunitário inato é constituído pelas barreiras anatómicas e respostas celulares contra a infeção. As barreiras anatómicas físicas são a primeira linha de defesa, prevenindo que os agentes infecciosos entrem no organismo pois, estas barreiras incluem substâncias solúveis especializadas que têm atividade antimicrobiana. As respostas celulares da imunidade inata são respostas rápidas, não específicas que são desencadeadas por padrões moleculares conservados associados aos agentes patogénicos (PAMPs), reconhecidos pelos fagócitos (Owen, Punt e Stranford, 2013).

Alguns patogénicos têm a capacidade de escapar à resposta inata, sendo necessária uma resposta mais especializada e efetiva para combater estes agentes, como é o caso do sistema imunitário adquirido. O sistema imunitário adquirido é constituído pela imunidade humoral e imunidade celular. A imunidade humoral é mediada por anticorpos produzidos pelos plasmócitos e a imunidade celular mediada por linfócitos T. Deste modo, a resposta imunológica adquirida complementa a resposta imunológica inata (Owen, Punt e Stranford, 2013).

### **4.1 Laboratório de Imunologia**

As amostras biológicas que são processadas neste sector são soro, LCR e urina de 24h. Nestas amostras podem ser realizadas imunofixações séricas e urinárias, determinação de IgE específica a alérgenos, eletroforese das proteínas séricas (proteinograma) e determinação de parâmetros imunoquímicos.

Durante as 7 semanas que estive no laboratório de Imunologia acompanhei a receção e processamento das diferentes amostras, realizei algumas técnicas (proteinogramas e imunofixações) e a validação dos resultados.

#### 4.1.1 Parâmetros imunoquímicos

No laboratório de imunologia são determinados diariamente vários parâmetros imunoquímicos. Estes parâmetros são determinados por nefelometria e por turbidimetria (Tabela I).

**Tabela I** – Parâmetros imunoquímicos determinados no laboratório de imunologia e respetiva metodologia e equipamento utilizado.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros imunoquímicos
<b>BN ProSpec</b>	<b>Nefelometria:</b> mede a dispersão de luz num ângulo de 90°, quando um raio de luz incidente atravessa a suspensão. A intensidade de luz dispersa é diretamente proporcional à quantidade de antigénio na amostra (Burtis e Bruns, 2016).	<b>LCR:</b> Albumina, IgG <b>Soro:</b> Albumina, IgG, Pré-albumina, Haptoglobina, Fator reumatóide, $\alpha$ 1-antitripsina, cadeias leves livres $\kappa$ e $\lambda$ , Anti-Streptolisina O, Saturação da Transferrina, Cistatina C, Subclasses de IgG, ADNase, IgD, entre outros. <b>Urina:</b> cadeias leves livres $\kappa$ e $\lambda$ , $\beta$ 2-microglobulina
<b>Optilite</b>	<b>Turbidimetria:</b> mede a turvação de uma solução, através da intensidade luz transmitida num ângulo de 0° ou 180°. Quanto mais complexos antigénio-anticorpo estão presentes, maior quantidade de luz é dispersa da luz incidente, resultando na diminuição da intensidade de luz transmitida (Burtis e Bruns, 2016).	<b>Soro:</b> Complemento total (CH50), Subclasses de IgA, cadeias leves livres $\kappa$ e $\lambda$ <b>Soro:</b> IgG, IgA, IgM, IgE, $\beta$ 2-microglobulina, C3, C4, Ceruplasmina, entre outros.
<b>Alinity</b>		

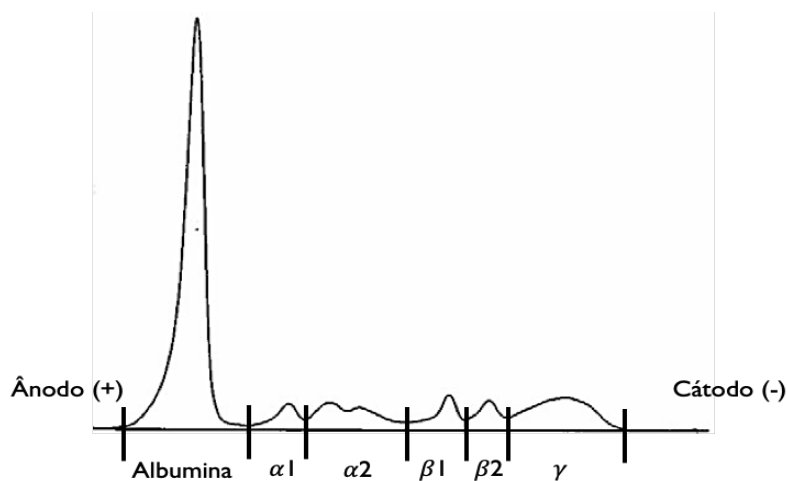
#### 4.1.2 Eletroforese das proteínas séricas

No laboratório de Imunologia do CHUC, a eletroforese das proteínas do soro também denominada proteinograma, é realizada no equipamento automatizado *Capillarys 2* da SEBIA que utiliza o princípio da eletroforese de zona capilar. Este equipamento possui oito capilares de sílica, podendo realizar-se oito amostras em simultâneo. A forte carga negativa no interior do capilar assim como o seu diâmetro estreito, proporcionam uma área negativa superficial grande, estabelecendo-se um forte fluxo endosmótico de catiões em direção ao cátodo. As proteínas migram em direção ao cátodo, sendo que a sua migração varia de acordo a carga negativa das proteínas. Assim, as proteínas são separadas com base na sua

carga pelo campo elétrico aplicado. A detecção é feita pela absorção de luz ultra-violeta (200-215nm) das ligações peptídicas, resultando assim no proteinograma (Morrison *et al.*, 2019).

As amostras migram através dos capilares que contem um tampão apropriado, separando-as nas tradicionais frações eletroforéticas: Albumina,  $\alpha$ 1-Globulinas,  $\alpha$ 2-Globulinas,  $\beta$ 1-Globulinas,  $\beta$ 2-Globulinas e  $\gamma$ -Globulinas (Figura 1).

Esta técnica é particularmente utilizada quando há elevação dos níveis de imunoglobulinas, para distinguir expansão de imunoglobulinas monoclonais de policlonais.



**Figura 1** - Eletroforese capilar de um soro normal.

No campo elétrico, a carga negativa das proteínas migra em direção ao positivo (ânodo), separando-as de acordo com a sua carga. No proteinograma são distinguidas seis frações: Albumina,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\gamma$ . (Adaptada de (Lee *et al.*, 2015)).

### i. Frações normais das proteínas do soro

A eletroforese de zona capilar gera seis frações: Albumina,  $\alpha$ 1-Globulinas,  $\alpha$ 2-Globulinas,  $\beta$ 1-Globulinas,  $\beta$ 2-Globulinas e  $\gamma$ -Globulinas que contêm quantidades variáveis de diferentes proteínas.

#### Fração Albumina

Proteína de 69 kDa sintetizada no fígado, sendo a proteína mais abundante no soro (Morrison *et al.*, 2019).

Funções: manutenção da pressão oncótica, proteína de transporte de esteróides, ácidos gordos, hormonas, bilirrubina e fármacos em circulação (Morrison *et al.*, 2019).

**Diminuição da fração:** inflamação, sépsis, má-nutrição, síndrome nefrótico, doença renal, doença hepática, hemodiluição (artefacto) (Lee *et al.*, 2017).

**Aumento da fração:** desidratação (Lee *et al.*, 2017).



## Fração $\alpha 1$

Proteínas típicas nesta fração:  $\alpha 1$ -antitripsina,  $\alpha 1$ -lipoproteína,  $\alpha 1$ -fetoproteína,  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida e  $\alpha 1$ -antiquimiotripsina (Lee *et al.*, 2017; Morrison *et al.*, 2019).

A  $\alpha 1$ -antitripsina é a proteína mais abundante nesta fração. Esta é uma proteína de fase aguda e os seus níveis alteram-se em resposta à inflamação (Morrison *et al.*, 2019).

**Deficiência em  $\alpha 1$ -antitripsina:** doenças pulmonares (enfisemas e bronquiectasias), doenças hepáticas (hepatite e cirrose) e vasculites (Lee *et al.*, 2017).

**Aumento de  $\alpha 1$ -fetoproteína:** tumores hepáticos, tumores da linha germinativa, gravidez, estados inflamatórios (Lee *et al.*, 2017).

## Fração $\alpha 2$

Inclui várias proteínas tais como:  $\alpha 2$ -macroglobulina, haptoglobina, ceruloplasmina e proteínas do complemento. Esta fração tal como a  $\alpha 1$ , contém proteínas de fase aguda (Morrison *et al.*, 2019).

A  $\alpha 2$ -macroglobulina é a mais abundante nesta fração e a sua função é inibir a plasmina assim como outras proteases séricas. O seu aumento está relacionado com o síndrome nefrótico, pois a sua síntese está aumentada e não tem capacidade de passar pelo glomérulo (Morrison *et al.*, 2019).

A haptoglobina liga-se à hemoglobina livre libertada pela hemólise intravascular para proteger danos renais e reter ferro. O reconhecimento do complexo hemoglobina-haptoglobina é relevante na interpretação dos padrões eletroforéticos nas amostras hemolizadas, pois pode provocar um aumento da fração  $\alpha 2$ .

**Diminuição da fração:** doenças hepáticas, hemólise, má-nutrição, doença de Wilson (Lee *et al.*, 2017).

**Aumento da fração:** estados inflamatórios, utilização de esteroides, insuficiência adrenal, síndrome nefrótico, Diabetes *Mellitus* severo (Lee *et al.*, 2017).

## Fração $\beta$

Dependendo do sistema eletroforético utilizado pode ser dividida numa fração única ou nas frações  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . Inclui várias proteínas tais como: transferrina,  $\beta 1$ -lipoproteína, hemopexina e as proteínas C3 e C4 do complemento (Morrison *et al.*, 2019).

Componente major da fração  $\beta 1$  é a transferrina que é produzida pelo fígado. Esta proteína transporta a hemoglobina que não está ligada ao ferro no sangue. Um aumento na sua

produção é consistente com uma deficiência de ferro e aumento da fração  $\beta_1$ . A sua diminuição está associada a inflamação aguda, doença renal e cirrose (Morrison *et al.*, 2019). A lipoproteína  $\beta_1$  migra entre a fração  $\alpha_2$  e  $\beta_1$  na eletroforese capilar, sendo que as proteínas monoclonais IgM e IgA podem produzir um padrão de migração semelhante, deve-se ter em consideração qualquer alteração nesta região (Morrison *et al.*, 2019).

**Diminuição da fração  $\beta_1$ :** má-nutrição (Lee *et al.*, 2017).

**Aumento da fração  $\beta_1$ :** deficiência em ferro, gravidez, estados inflamatórios, hiperlipidémia (Lee *et al.*, 2017).

Componente major da fração  $\beta_2$  é a proteína do complemento C3. Esta proteína pode estar aumentada numa resposta de fase aguda, obstrução biliar e em alguns pacientes com glomeruloesclerose focal. Por outro lado, esta proteína pode estar diminuída em situações em que há consumo de C3, ou seja, em situações de infeção, doenças inflamatórias (lúpus, vasculites autoimunes) e doenças nefríticas (Morrison *et al.*, 2019).

A proteína monoclonal que mais comumente migra na fração  $\beta$  é a IgA, no entanto também podem migrar IgM e IgG monoclonais (Morrison *et al.*, 2019).

**Diminuição da fração  $\beta_2$ :** consumo de C3 (Lee *et al.*, 2017).

**Aumento da fração  $\beta_2$ :** estados inflamatórios (Lee *et al.*, 2017).

## Fração $\gamma$

Esta fração contem as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM (IgD e IgE em baixas concentrações), a proteína C-reativa e o fibrinogénio (entre a região  $\beta$ - $\gamma$ ) (Morrison *et al.*, 2019).

O fibrinogénio é uma proteína plasmática, estando ausente no soro, no entanto aquando a presença de uma terapia elevada com anticoagulante pode estar presente (Morrison *et al.*, 2019).

A proteína C-reativa normalmente não é visível, no entanto aumenta durante a inflamação. A sua migração geralmente é a meio da fração  $\gamma$  (Morrison *et al.*, 2019).

**Diminuição da fração:** imunodeficiência humoral hereditária, doença renal, sépsis, má-nutrição, infeções virais, amiloidose, leucemias (Lee *et al.*, 2017).

**Aumento da fração:** imunoglobulinas policlonais (infeções ou inflamação), proteínas monoclonais (exemplo: mieloma múltiplo, linfoma, macroglobulinémia de Waldenstrom) (Lee *et al.*, 2017).

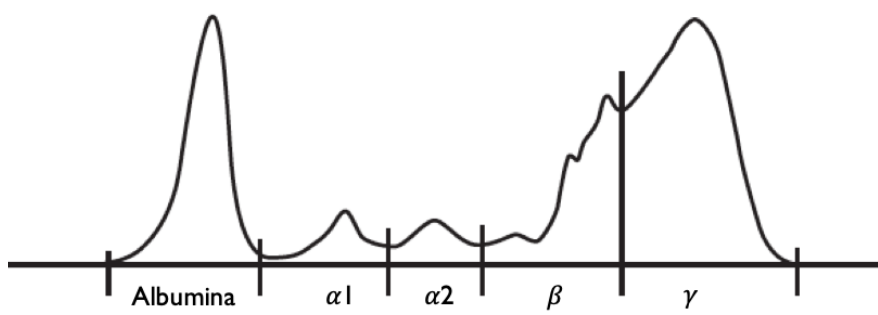
## ii. Padrão eletroforético de doença hepática

### ▪ Cirrose

Quando existem grandes alterações dos hepatócitos há alteração da síntese de proteínas que o fígado produz em situações normais. Numa fase inicial de lesão hepática, há aumento de algumas proteínas de fase, como é o caso da  $\alpha$ 1-antitripsina. Contudo, o aumento ou diminuição de um analito em particular, depende não só do aumento do estado inflamatório assim como da diminuição do número de hepatócitos que sintetizam proteínas (Keren, 2003).

Normalmente é possível observar uma diminuição da albumina (hipoalbuminémia), aumento da  $\alpha$ 1-antitripsina, hipergamaglobulinémia e por vezes diminuição da haptoglobina. A síntese de albumina está alterada assim como de outras proteínas, devido ao número de hepatócitos que ainda possuem as suas capacidades de síntese. No entanto, a hipoalbuminémia em muitos indivíduos é resultado da distribuição alterada de albumina, devido à presença de ascite nestes indivíduos e não necessariamente devido a alteração na síntese de albumina (Keren, 2003).

O aumento da fração  $\beta$ - $\gamma$  na cirrose, resulta de um aumento policlonal de IgA (Figura 2). O aumento da fração  $\gamma$  deve-se ao aumento das restantes imunoglobulinas policlonais que normalmente estão relacionadas com uma resposta imunitária contra antígenos entéricos (Figura 2) (Keren, 2003). A banda policlonal caracteriza-se por ser uma mistura de várias imunoglobulinas, derivadas de diferentes células B, apresentando-se como uma curva simétrica no perfil eletroforético.



**Figura 2** - Padrão eletroforético característico de cirrose.

No proteinograma é possível observar uma diminuição da albumina, um aumento da fração  $\alpha$ 1, da fração  $\gamma$ , assim como uma "ponte" entre a fração  $\beta$ - $\gamma$ . Contudo, a fração  $\alpha$ 2 não sofre alteração. (Adaptada de (Keren, 2003)).

## ▪ **Obstrução biliar**

A obstrução biliar pode ser resultado de vários processos patológicos como a cirrose biliar primária, obstrução biliar por cálculos, inflamação ou neoplasias. A principal característica observável no padrão eletroforético é na fração albumina, devido à ligação da albumina à bilirrubina, onde se verifica um aumento desta fração (Keren, 2003).

Por outro lado, pode ser visível um aumento de C3,  $\beta$ 1-lipoproteína, proteínas de fase aguda e ocasionalmente um aumento das  $\gamma$ -globulinas, principalmente em pacientes com cirrose biliar primária (Keren, 2003).

### **iii. Padrão eletroforético de doença renal**

Na presença de síndrome nefrótica é possível observar características consistentes com um padrão de diminuição de albumina,  $\alpha$ 1-globulina e  $\gamma$ -globulina. A fração  $\alpha$ 2 e  $\beta$  por vezes podem estar elevadas.

O padrão de síndrome nefrótica resulta da perda de proteínas do soro através de lesões no nefrónio. Numa tentativa de restaurar a pressão oncótica, há aumento da síntese proteica das proteínas do soro como mecanismo de compensação, pois estas proteínas são relativamente grandes ( $\alpha$ 2-macroglobulina e  $\beta$ 1-lipoproteína) e não passam o glomérulo, ficando retidas no soro. Por isso, em muitos pacientes se observa a  $\alpha$ 2-macroglobulina como proteína major do soro (Keren, 2003).

A eletroforese do soro apenas deteta casos mais graves de lesão renal. Contudo, a realização de urianálise de rotina, o estudo de proteínas específicas e/ou eletroforese da urina pode ajudar a determinar a extensão da lesão renal, assim como a sua localização (Keren, 2003).

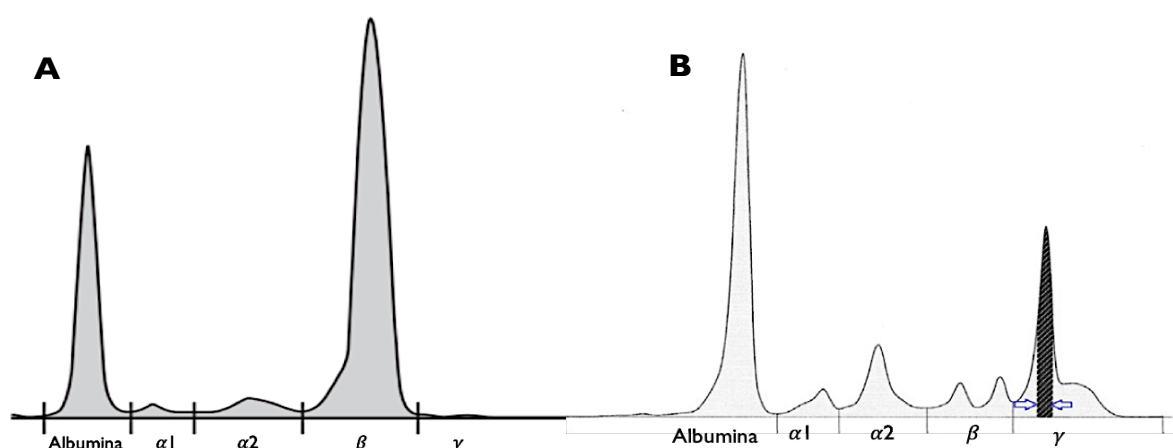
### **iv. Deteção de proteínas monoclonais no soro**

No laboratório de Imunologia do CHUC, diariamente são detetadas ou monitorizadas condições associadas a gamopatias monoclonais. Estas podem estar associadas a doenças linfoproliferativas benignas, infeções e neuropatias. A gamapatia monoclonal mais comum no soro é a Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS) que pode evoluir para uma condição linfoproliferativa maligna, como é o caso do Mieloma Múltiplo (Keren, 2003).

Um sistema imunitário saudável, a medula óssea produz uma grande variedade de linfócitos B, cada um com habilidade para facilitar a eliminação de antígenos. Quando os linfócitos B são expostos a um antígeno, são ativados e diferenciam-se em plasmócitos – células que secretam grandes quantidades de imunoglobulinas para esse antígeno (Morrison *et al.*, 2019).

O Mieloma Múltiplo é uma neoplasia dos plasmócitos, que se caracteriza pela proliferação de plasmócitos clonais na medula óssea, que secretam um único tipo de imunoglobulina monoclonal. As imunoglobulinas podem ser IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. São compostas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas unidas por ligações dissulfeto. No entanto, a imunoglobulina monoclonal pode ser composta apenas por cadeias leves Kapa ( $\kappa$ ) ou Lambda ( $\lambda$ ), ou raramente apenas por cadeias pesadas (Morrison *et al.*, 2019). O pico monoclonal caracteriza-se como uma banda estreita e elevada, devido à proliferação de apenas um tipo de Ig em elevada concentração.

A maioria das proteínas monoclonais são do tipo IgG e por isso migram na região  $\gamma$ . No entanto, se forem do tipo IgA ou IgM podem migrar na região  $\beta$  (Figura 3).



**Figura 3** - Eletroforese das proteínas sérias com presença de pico monoclonal.

No proteinograma (A) é possível observar um pico monoclonal na fração  $\beta$ , devido à presença de proteína monoclonal do tipo IgA ou IgM. (Adaptada de (Keren, 2003)). No proteinograma (B) é possível observar um pico monoclonal na fração  $\gamma$ , devido à presença de proteína monoclonal do tipo IgG. (Adaptada de (Morrison *et al.*, 2019)).

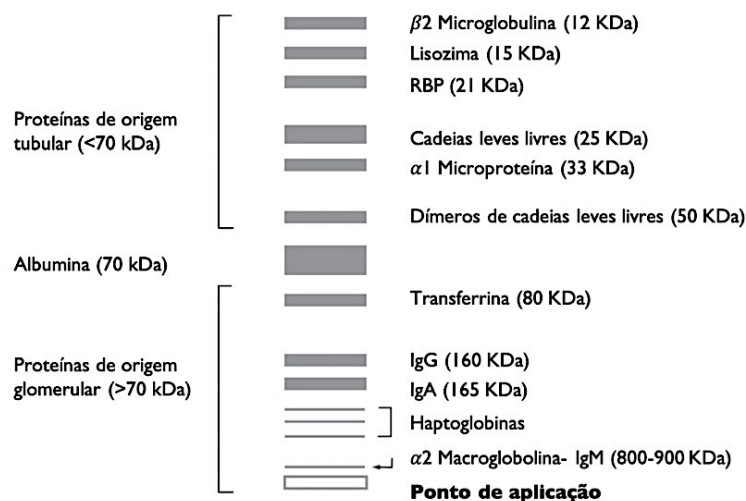
A eletroforese das proteínas do soro é muito importante na identificação e monitorização de proteínas monoclonais tanto no MGUS como no Mieloma Múltiplo. No entanto, quando há uma suspeita de proteína monoclonal no soro deve-se realizar uma imunofixação do soro para confirmação.

### 4.1.3 Eletroforese das proteínas urinárias

A realização de eletroforese das proteínas urinárias é muito utilizada em pacientes que se suspeite de mieloma múltiplo, na monitorização da atividade desta doença e em doentes renais. Normalmente a urina, possui uma baixa quantidade de proteínas em indivíduos saudáveis, não excedendo 150 miligramas/24h. O glomérulo serve de barreira, retendo proteínas superiores a >100 kDa, sendo que as que passam pelo glomérulo são novamente reabsorvidas em condições normais. O perfil eletroforético e a quantidade das proteínas urinárias pode variar de acordo com os estados patológicos. Num indivíduo saudável, o proteinograma urinário não apresenta proteínas ou apresenta pequenas quantidades de albumina (Morrison *et al.*, 2019).

A avaliação do conteúdo de proteínas nas amostras de urina é extremamente útil no que diz respeito à localização e grau de lesão renal, assim como a presença ou ausência de proteínas monoclonais (Morrison *et al.*, 2019). Esta avaliação é feita por eletroforese das proteínas urinárias utilizando o kit HYDRAGEL 5 PROTEINURIE da SEBIA, no equipamento HYDRASYS semiautomático de eletroforese, que separa as proteínas de acordo com o seu peso molecular num gel de agarose. Após migração das proteínas no gel, é realizada a coloração com violeta ácido, sendo o resultado visualmente comparado com o marcador de peso molecular das diferentes proteínas aplicado no poço do gel, permitindo assim classificar o tipo de proteinúria.

No gel é possível caracterizar qual o tipo de proteinúria de acordo com as proteínas que são observadas: proteínas de origem tubular, glomerular ou albumina (Figura 4).



**Figura 4** - Ilustração representativa do padrão de migração das proteínas urinárias (Adaptada de SEBIA, 2013).

Na ilustração é possível observar quais as proteínas que podem aparecer no proteinograma urinário e as respetivas origens.

## **i. Proteinúria glomerular e proteinúria tubular**

A alteração da função glomerular, altera a composição do filtrado e conseqüentemente das proteínas urinárias. Em norma, pacientes com lesão glomerular excretam maior quantidade de proteínas do que pacientes com lesão tubular. A disfunção tubular previne a absorção de pequenas proteínas que normalmente passam o glomérulo, enquanto que a disfunção glomerular permite a passagem de proteínas sérica com >70 kDa (Keren, 2003; Morrison *et al.*, 2019).

Na maioria dos casos a proteinúria glomerular é provocada pela Diabetes *Mellitus* e doenças imunológicas renais. Quando há lesão glomerular, grandes moléculas passam o filtrado glomerular juntamente com pequenas proteínas, sendo algumas reabsorvidas pelos túbulos renais. Nos padrões de eletroforese de proteinúria glomerular é possível observar predominantemente a albumina,  $\alpha$ 1-antitripsina e transferrina (Keren, 2003).

A quantidade e tamanho das proteínas que passam os capilares glomerulares depende do grau de lesão glomerular (Keren, 2003).

Na presença de doença tubular, os pacientes têm uma seletividade glomerular normal, pois só as pequenas moléculas passam para o filtrado glomerular e conseqüentemente para a urina.

Existem vários fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de lesão tubular, nomeadamente, isquemia transitória, exposição a metais pesados e toxinas. No entanto algumas lesões podem ser reversíveis (Keren, 2003).

## **ii. Proteinúria Bence Jones**

A presença de cadeias leves livres monoclonais  $\kappa$  ou  $\lambda$  não associada com as cadeias pesadas das imunoglobulinas na urina, é designada de proteinúria de Bence Jones. Esta proteinúria é muito característica dos mielomas múltiplos (Morrison *et al.*, 2019).

A maioria das cadeias leves livres monoclonais  $\kappa$  são secretadas como monómeros (25 kDa), no entanto pode ocorrer dimerização. A maioria das cadeias leves livres monoclonais  $\lambda$  existem como dímeros (50 kDa). As cadeias leves livres têm a capacidade de passar através do glomérulo, sendo reabsorvidas nos túbulos proximais renais. Contudo, a função de reabsorção está comprometida quando há subprodução, resultando na excreção renal das cadeias leves livres monoclonais (Keren, 2003).

As cadeias leves livres são frequentemente encontradas em casos de Mieloma Múltiplo (50-60%), de MGUS (14%) e amiloidose (60%) (Keren, 2003).

Em norma, a amostra utilizada é a urina de 24h que permite detetar, quantificar e monitorizar a progressão da doença. Nos doentes com Mieloma Múltiplo, ou com suspeita da doença, realiza-se uma imunofixação urinária. Esta imunofixação tem como objetivo, caracterizar e identificar a proteína monoclonal na urina (Keren, 2003).

#### **4.1.4 Imunofixação**

A imunofixação é uma técnica utilizada para a identificação de proteínas após separação por eletroforese. No laboratório de imunologia esta técnica é realizada nos géis de agarose HYDRAGEL da SEBIA que são colocados no sistema HYDRASYS semiautomático de eletroforese, que permite realizar todos os passos necessários da imunofixação.

A imunofixação consiste primariamente na técnica de eletroforese em gel de agarose, que separa as proteínas presentes na amostra. Após migração das proteínas no gel, são aplicadas imunoglobulinas de mamífero monoespecíficas (anti-soros) para IgG, IgA, IgM, cadeias leves (livres e ligadas)  $\kappa$  e  $\lambda$  humanas, diretamente no gel. Estes anti-soros difundem no gel, precipitando as proteínas correspondentes a cada um destes anti-soros. O imunoprecipitado formado fica aprisionado no gel, sendo as restantes proteínas removidas por lavagem e absorção com papel de filtro. Por fim, é realizada uma coloração com violeta ácido, que permitirá identificar as bandas correspondentes às proteínas precipitadas (Csako, 2012).

Em cada gel, há um poço que serve de referência do perfil eletroforético das proteínas presentes na amostra. As amostras são assim aplicadas em seis poços do gel (sendo o primeiro poço o de referência), que irão ser testados em simultâneo, utilizando em cada um dos anticorpos monoespecíficos anti-cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA),  $\mu$  (IgM) e anti-cadeias leves (livres e ligadas)  $\kappa$  e  $\lambda$ . Caso não seja possível identificar o componente monoclonal com os anti-soros anteriormente referidos, realiza-se uma nova imunofixação, utilizando os anti-soros anti-cadeias pesadas  $\epsilon$  (IgE) e  $\delta$  (IgD) e anti-cadeias leves (livres e ligadas)  $\kappa$  e  $\lambda$ .

##### **i. Imunofixação sérica**

A imunofixação do soro é utilizada para confirmação das alterações detetadas pela eletroforese das proteínas do soro ou para possibilitar a deteção de proteínas monoclonais que não foram detetadas na eletroforese (Morrison *et al.*, 2019).



## ii. **Imunofixação urinária**

A imunofixação urinária é utilizada para confirmar a suspeita de componente monoclonal ou monitorizar a doença. Tal como na eletroforese das proteínas urinárias, a amostra utilizada na imunofixação é preferencialmente a urina de 24h (Morrison *et al.*, 2019).

Nas imunofixações urinárias podem ser encontradas apenas cadeias leves monoclonais  $\kappa$  ou  $\lambda$ , cadeias leves livres monoclonais  $\kappa$  ou  $\lambda$  e cadeias pesadas intactas. Estas evidências quando encontradas são consistentes com o diagnóstico de Mieloma Múltiplo (Morrison *et al.*, 2019).

A presença de cadeias pesadas monoclonais na urina indica presença de lesão renal (Morrison *et al.*, 2019).

### **4.1.5 Pesquisa de crioglobulinas**

As crioglobulinas são imunoglobulinas que agregam/precipitam a temperatura inferior a 37°C, por isso a manutenção da temperatura é crucial nestas amostras. Durante a fase pré-analítica e processamento das amostras é importante manter as amostras a 37°C, uma vez que qualquer diminuição da temperatura contribui para a agregação/precipitação destas imunoglobulinas (Keren, 2003; Morrison *et al.*, 2019).

Para realizar a pesquisa de crioglobulinas, são colhidos três tubos de sangue, dos quais são separados o soro para um único tubo. Este tubo de soro é mantido durante sete dias a 4°C e observado diariamente. Após este período, se se observar a formação de um precipitado no fundo do tubo, sugere a possível presença de crioglobulinas. Os tubos que contêm o precipitado são centrifugados a 5°C. O sobrenadante é rejeitado e o crioprecipitado lavado três vezes com soro fisiológico. Após a última lavagem é adicionado soro fisiológico na mesma proporção de soro inicial.

Os tubos que contêm o precipitado se colocados novamente a 37°C e houver resolubilização indica a presença de crioglobulinas (Keren, 2003).

Para caracterização do tipo de crioglobulina recorre-se à metodologia de imunofixação do soro dos pacientes. Na imunofixação as crioglobulinas produzem uma banda proteica característica. É importante determinar qual o tipo de crioglobulinas: Tipo I, Tipo II ou III (Tabela 2), pois a interpretação do tipo II ou III pode ter consequências clínicas significativas, devido à presença de componente monoclonal (Morrison *et al.*, 2019).

**Tabela 2** - Classificação de crioglobulinas de acordo com o sistema Brouet (Adaptado de Keren, 2003; Morrison *et al.*, 2019).

Tipo de Crioglobulinas	Descrição	Composição das Crioglobulinas
<b>Tipo I</b>	Crioglobulina monoclonal	IgM, IgG, IgA ou Bence Jones
<b>Tipo II</b>	Crioglobulina mista com componente monoclonal e policlonal IgG	IgM-IgG IgG-IgG IgA-IgG
<b>Tipo III</b>	Crioglobulina mista policlonal	IgM-IgG IgM-IgG-IgA

As crioglobulinémias são clinicamente significativas, uma vez que podem ocorrer obstruções vasculares e/ou vasculites resultantes da resposta inflamatória, provocada pela deposição de imunocomplexos (Keren, 2003). A maioria das crioglobulinémias não são provocadas por proteínas monoclonais mas são resultado de infecções (HIV ou Hepatite C) ou doenças autoimunes (Morrison *et al.*, 2019).

#### 4.1.6 Determinação de IgE específica

Algumas doenças do sistema imunitário são provocadas por uma resposta exagerada e inapropriada do sistema inato e/ou adaptativo, a antígenos que representam pouca ou nenhuma ameaça para o hospedeiro. Estas doenças são denominadas de hipersensibilidades (Owen, Punt e Stranford, 2013).

As reações alérgicas, são reações de Hipersensibilidade do Tipo I, mediadas por anticorpos do tipo IgE (Owen, Punt e Stranford, 2013). Os antígenos que estimulam a alergia são denominados alérgenos.

Em indivíduos normais, a IgE é das classes de imunoglobulinas mais baixas no soro. Nestes indivíduos normalmente os anticorpos do tipo IgE apenas são gerados em resposta a infecções parasitárias. Contudo, algumas pessoas têm predisposição a desenvolver estes anticorpos contra antígenos ambientais comuns, como é o caso de alguns pólenes de plantas, alimentos e fármacos (Owen, Punt e Stranford, 2013).

Os anticorpos do tipo IgE sozinhos não são destrutivos, no entanto, provocam hipersensibilidade quando se ligam a receptores expressos em várias células do sistema inato, como os mastócitos, basófilos e eosinófilos. Esta ligação ativa os granulócitos, levando à sua desgranulação para a corrente sanguínea. O conteúdo dos grânulos varia consoante a célula, incluindo normalmente histamina, heparina e proteases (Owen, Punt e Stranford, 2013).

As respostas de hipersensibilidade do tipo I são divididas em duas fases: uma fase de resposta imediata e uma fase de resposta mais tardia. A resposta imediata ocorre praticamente aquando a exposição ao alérgeno, resultando na libertação de histamina, leucotrienos e prostaglandinas pelos mastócitos no local de exposição. A resposta mais tardia é desencadeada horas após a exposição, pela libertação dos mediadores anteriores que induzem inflamação localizada. As citocinas libertadas pelos mastócitos aumentam a expressão de moléculas de adesão celular no endotélio vascular, promovendo o influxo de neutrófilos, eosinófilos e células T *Helper*, que caracterizam esta fase da resposta. As citocinas libertadas contribuem para a diferenciação e crescimento destas células, que consequentemente levam à desgranulação e libertação de mediadores inflamatórios que contribuem para lesões teciduais (Owen, Punt e Stranford, 2013).

As manifestações clínicas das reações alérgicas são muito variadas, desde anafilaxia sistémica, asma severa, reações localizadas como a rinite alérgica ou dermatite atópica (eczema). Estas manifestações dependem não só da concentração de alérgeno a que o indivíduo é exposto, como também da via de entrada e exposição prévia ao alérgeno (Owen, Punt e Stranford, 2013).

Normalmente a IgE possui uma meia-vida curta (2-3 dias), no entanto quando se liga aos recetores das células do sistema inato, é estável por várias semanas (Owen, Punt e Stranford, 2013).

No laboratório, para determinação da IgE específica é utilizada a metodologia de *Fluorescence enzyme immunoassay* (FEIA) no equipamento *ImmunoCAP* da Phadia. Este é um teste quantitativo, sensível e preciso para determinar a concentração de IgE contra um alérgeno em particular, em amostras de soro ou plasma.

O ensaio consiste numa fase sólida (celulose) na qual está acoplada covalentemente o alérgeno de interesse, que irá reagir com a IgE específica correspondente na amostra do paciente. A IgE não específica é removida por lavagem, sendo posteriormente adicionados anticorpos anti-IgE Humana marcados, com uma enzima. Após incubação, o anticorpo anti-IgE não ligado é removido por lavagem, permanecendo assim os complexos ligados formados, que vão incubar com o substrato da enzima. No fim da reação é medida a fluorescência resultante. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de IgE específica presente na amostra. Para calcular os resultados do teste, a resposta da amostra é transformada em concentrações de IgE utilizando a curva de calibração que é realizada com padrões de referência para IgE (Hage, Hamsten e Valenta, 2017; Johansson, 2004).

Este ensaio possui uma elevada sensibilidade, uma vez que, o excesso de antigénio imobilizado na fase sólida permite a ligação completa da IgE presente na amostra. Para além

disso, não há interferência de anticorpos IgG específicos para os alérgenos, conferindo assim precisão na determinação de IgE (Hage, Hamsten e Valenta, 2017; Johansson, 2004).

## **4.2 Laboratório de Autoimunidade**

Neste sector da imunologia a amostra biológica processada é o soro. Aqui são realizadas várias metodologias: Imunofluorescência Indireta (IFI), Radioimunoensaios, Ensaio Imunoenzimático e Quimioluminescência. Estas metodologias permitem não só o diagnóstico de doenças autoimunes, assim como a sua monitorização.

### **4.2.1 Doenças autoimunes**

Uma das características mais notáveis do sistema imunitário é a sua capacidade de reconhecer antígenos estranhos ao próprio organismo, desencadeando uma resposta imunitária com a finalidade de proteger o hospedeiro. A incapacidade de distinguir entre antígenos estranhos e antígenos do próprio organismo resulta por vezes na destruição de células e órgãos do hospedeiro, um processo denominado de autoimunidade (Owen, Punt e Stranford, 2013).

As células efectoras das doenças autoimunes são os linfócitos, B e T. Estes linfócitos possuem na sua superfície recetores (*B Cell Receptor*, BCR, em linfócitos B ou *T Cell Receptor*, TCR, em células T) que são utilizados por estes para o reconhecimento de antígenos, quer na sua conformação natural - no caso dos linfócitos B; ou no contexto de moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) - no caso dos linfócitos T (Owen, Punt e Stranford, 2013).

Todos os BCRs ou TCRs de um linfócito B ou T individual, respetivamente, tem a mesma especificidade para um dado antígeno. Durante o seu processo de desenvolvimento os linfócitos passam por uma fase de recombinação somática, originando até 10<sup>11</sup> especificidades para diferentes antígenos. Uma consequência inevitável da geração de este elevado número de especificidades é a geração aleatória de células B ou T que possuem a sua superfície BCR ou TCRs, respetivamente, que reconhecem antígenos do hospedeiro. No entanto, mecanismos de tolerância, central (em órgãos linfóides primários) ou periférica (em órgãos linfóides secundários), impedem a progressão e sobrevivência destes linfócitos com poder auto-destrutivo. A falha destes mecanismos de tolerância está na génese das doenças autoimunes (Owen, Punt e Stranford, 2013).

Nas doenças autoimunes há destruição de proteínas, células e órgãos do hospedeiro por autoanticorpos ou células T auto-reativas. Por isso, estas doenças são categorizadas como específicas de órgãos ou sistêmicas, dependendo se afetam um único órgão ou múltiplos sistemas do organismo. Nas doenças autoimunes mais prevalentes encontram-se por exemplo o Lúpus eritematoso disseminado, onde os indivíduos afetados produzem anticorpos contra um diverso leque de auto-antígenos, como DNA, histonas ou eritrócitos. Por outro lado, a esclerose múltipla representa um exemplo em que linfócitos T específicos contra mielina são clonalmente expandidos resultando no desenvolvimento de lesões inflamatórias ao longo de fibras nervosas mielinizadas no cérebro e espinal medula, com consequências que podem variar desde perda de sensibilidade até a paralisia (Owen, Punt e Stranford, 2013).

#### **4.2.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)**

A técnica de IFI permite a semi-quantificação de autoanticorpos presentes no soro do paciente. Nesta técnica estão fixados na lâmina antígenos, ou seja, o substrato adequado para o estudo (corte de tecido ou células). O soro do paciente é adicionado à lâmina e se o anticorpo específico estiver presente, reage com o antígeno formando um complexo. De seguida, é realizada uma lavagem para remoção do excesso de anticorpo e posteriormente adicionado um segundo anticorpo, anti-imunoglobulina humana conjugada com um fluorocromo (Isotiocina de Fluoresceína). Quando os anticorpos marcados com fluoresceína são adicionados, reagem com os anticorpos presentes no complexo antígeno-anticorpo, sendo possível observar a fluorescência por microscopia de fluorescência. Esta técnica é realizada manualmente ou automaticamente nos equipamentos: *IF Sprinter* (Euroimmun) ou *Mago* (Erba Mannheim).

Os resultados obtidos por IFI são expressos em títulos de diluição (maior diluição na qual a amostra é positiva). Inicialmente, a pesquisa de anticorpos anti-nucleares em adultos é feita 1:160, enquanto que em crianças com idade inferior a 5 anos é feita 1:80. A pesquisa de autoanticorpos em lâminas do mosaico hepático para adultos a diluição inicial é 1:100 e para crianças 1:40. Nas amostras positivas pode-se realizar titulação até 1:1280.

Para cada substrato usa-se um controlo positivo e um controlo negativo, com a finalidade de validar o ensaio. Quando o substrato são as células Hep-2 o controlo positivo normalmente utilizado é o padrão nuclear homogéneo.

No laboratório de imunologia do CHUC realiza-se a pesquisa de vários autoanticorpos, sendo que a escolha do substrato depende do autoanticorpo a pesquisar. Os substratos

utilizados são: Células Epiteliais Humanas do Tipo 2 (Hep-2), mosaico hepático e mosaico de granulócitos, entre outros.

#### **i. Anticorpos anti-nucleares (ANAs) e anti-citoplasmáticos**

A pesquisa destes autoanticorpos é essencial no diagnóstico, monitorização da atividade e classificação das doenças autoimunes. A técnica *gold standard* para pesquisa de autoanticorpos nucleares é a IFI, utilizado como substrato as células Hep-2, uma linha celular derivada do carcinoma da laringe humano. Estas células são utilizadas porque possuem elevada heterogeneidade na sua morfologia, na expressão antigénica e devido ao seu comportamento na divisão celular (elevada atividade mitótica) (Chan *et al.*, 2015).

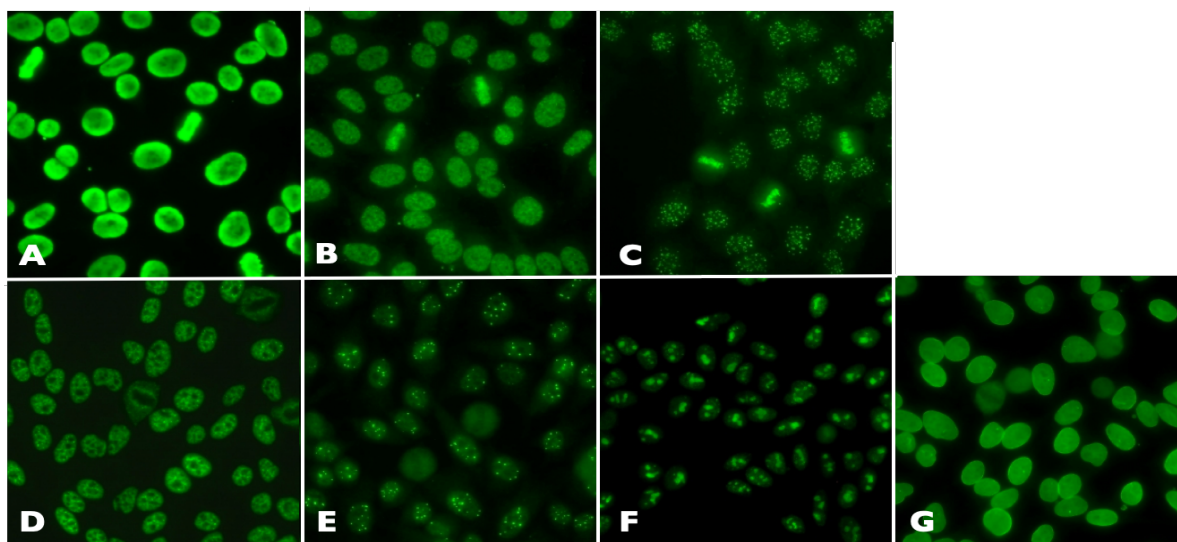
Após realização da IFI e observação microscópica é possível distinguir e caracterizar as diferentes estruturas celulares, o que possibilita a pesquisa de autoanticorpos contra constituintes nucleares e citoplasmáticos da célula. Os padrões de imunofluorescência obtidos podem ser divididos em padrões nucleares e padrões citoplasmáticos, pois cada autoanticorpo caracteriza-se por uma fluorescência típica dependendo do antígeno correspondente (Tabela 3, Tabela 4), (Figura 5, Figura 6).

Estes padrões correlacionam-se com muitas doenças autoimunes, por isso, quando a IFI é positiva são utilizadas outras metodologias para identificação dos antígenos associados a estas patologias.

**Tabela 3** - Padrões nucleares mais comuns, com os respectivos antígenos associados e correlação clínica.

Existem 14 padrões nucleares definidos, no entanto na tabela apenas estão exemplificados os padrões mais comuns (Adaptado de (Chan *et al.*, 2015)).

Tipo de padrão	Descrição	Antígenos associados	Correlação clínica
<b>Padrão nuclear</b>			
Homogéneo	Fluorescência homogénea em todo o nucleoplasma. Os nucléolos podem ser corados ou não. Mitoses com cromatina corada intensamente.	dsDNA, nucleossomas, histonas	Artrite idiopática juvenil, Lúpus Eritematoso sistémico (LES), LES induzido por drogas.
Finogranular denso	Núcleos com padrão finogranular heterogéneo em células em interfase. Metafases com padrão granular, com grânulos grosseiros.	DFS70/LEDGF	Raro em: Síndrome de Sjögren, Esclerose sistémica, LES.
Centrómero	Pontos grosseiros nas células em interfase.	CENP-A/B	Esclerose sistémica forma cutânea limitada, cirrose biliar primária.
Mosqueado	Nucleoplasma granular grosseiro. Núcleolos podem ser corados ou não. Mitoses apresentam cromatina não fluorescente.	hnRNP, U1RNP, Sm, RNA polimerase III	Doenças mista do tecido conjuntivo, Esclerose sistémica, LES.
Múltiplos pontos nucleares	Vários pontos nucleares (6-20 por célula).	Sp-100, proteínas PML, MJ/NXP-2	Cirrose biliar primária, Dermatomiosite, Doenças auto-imunes reumáticas sistémicas.
Nucleolar homogéneo	Fluorescência difusa nos nucléolos.	PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleofosmina, nucleolina, No55/SC65	Esclerose sistémica, Síndrome de sobreposição esclerose sistémica/poliomiosite.
Membrana nuclear	Núcleo com coloração homogénea. Fluorescência acentuada nos locais de contacto de células adjacentes.	Lamina A,B,C ou proteínas associadas às lamínas	LES, Síndrome de Sjögren, artrites seronegativas.



**Figura 5** - Padrões de fluorescência nuclear em células Hep-2.

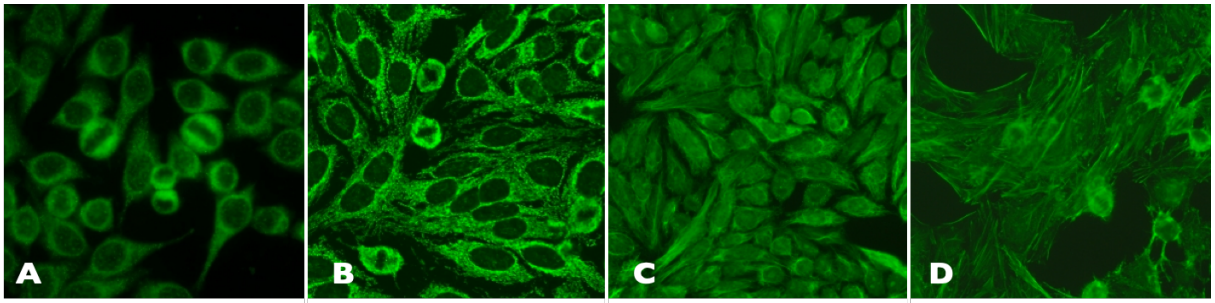
Na figura é possível observar alguns dos padrões nucleares: homogêneo (A), finogranular denso (B), centrômero (C), mosqueado (D), múltiplos pontos nucleares (E), nucleolar homogêneo (F) e membrana nuclear (G) (Adaptada de *International Consensus on ANA patterns*).

**Tabela 4** - Padrões citoplasmáticos mais comuns, com os respectivos antígenos associados e correlação clínica.

Existem 8 padrões citoplasmáticos definidos, no entanto na tabela apenas estão exemplificados os padrões mais comuns (Adaptado de (Chan *et al.*, 2015)).

Tipo de padrão	Descrição	Antígenos associados	Correlação clínica
<b>Padrão citoplasmático</b>			
Finogranular denso	Pontos pequenos e dispersos no citoplasma.	Jo-1/ histidil-tRNA sintetase	Síndrome anti-sintetase, Polimiosite/Dermatomiosite, Esclerose sistêmica forma limitada, Efluxão pleural idiopática.
Finogranular sugestivo de anticorpos anti-mitocôndrias (AMA)	Grânulos grosseiros ao longo do citoplasma.	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, Subunidade E1 $\alpha$ da PDC, E3BP/proteína X	Comum na cirrose biliar primária, Esclerose sistêmica.
Filamentoso fibrilar	Coloração dos microtúbulos e filamentos intermediários.	Vimentina, citoqueratina, tropomiosina	Condições infecciosas ou inflamatórias, psoríase, doenças auto-imunes reumáticas sistêmicas.
Filamentoso linear	Coloração das fibras do citoesqueleto, filamentos estriados de actina longitudinais ao longo da célula.	Actina, miosina não muscular	Doenças auto-imunes reumáticas sistêmicas, Doença de Crohn, Cirrose biliar primária, Miastenia Gravis.



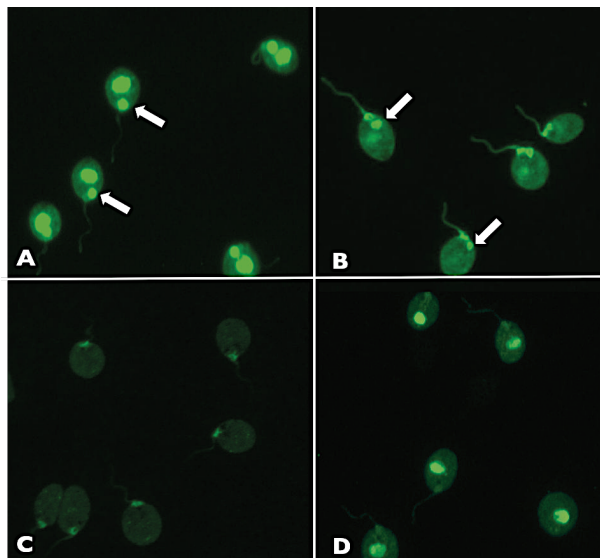


**Figura 6** - Padrões de fluorescência citoplasmáticos em células Hep-2.

Na figura é possível observar alguns dos padrões citoplasmáticos: finogranular denso (A), finogranular sugestivo de anticorpos anti- mitocôndrias (AMA) (B), filamentos fibrilar (C), filamentos linear (D) (Adaptada de *International Consensus on ANA patterns*).

## ii. Anticorpos anti-dsDNA

A pesquisa de autoanticorpos anti-*double-stranded* DNA (anti-dsDNA) quando realizada por IFI, utilizada como substrato a *Crithidia luciliae*, um hemoflagelar. Este método permite a detecção destes autoanticorpos, uma vez que este protozoário tem um cinetoplasto (mitocôndria que contem uma grande quantidade de dsDNA muito condensado). O cinetoplasto tem poucas proteínas, e por isso permite uma detecção de anticorpos anti-dsDNA mais seletiva. Assim, quando o cinetoplasto apresenta fluorescência indica a presença de anticorpos anti-dsDNA. A presença de fluorescência no núcleo, assim como, no corpo basal deste protozoário, não é valorizável (Gerlach *et al.*, 2015).



**Figura 7** - Padrões de fluorescência na *Crithidia luciliae*.

As amostras positivas para anti-dsDNA apresentam fluorescência no cinetoplasto, no entanto podem apresentar sinais de fluorescência adicionais no núcleo (A), no corpo basal (B) ou em ambos. As amostras negativas (C) e (D) não apresentam fluorescência no cinetoplasto (Adaptado de (Gerlach *et al.*, 2015)).

Estes autoanticorpos são muito importantes para o diagnóstico de LES, sendo por isso um marcador de atividade da doença e envolvimento renal muito específicos.

Quando se observa a IFI em células Hep-2 e se verificam mitoses com cromatina corada intensamente em pacientes sem qualquer histórico de doença autoimune, realiza-se um teste de *screening* para estes autoanticorpos pela metodologia de FEIA. Se o *screening* for positivo, procede-se à quantificação destes autoanticorpos por radioimunoensaio (*gold standard*). A metodologia de radioimunoensaio é utilizada para monitorização dos pacientes com histórico de anti-dsDNA positivo, uma vez que esta técnica permite uma quantificação dos autoanticorpos anti-dsDNA no soro.

### iii. Mosaico hepático

As doenças autoimunes hepáticas incluem: hepatite autoimune, cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária. A presença de autoanticorpos específicos facilitam o diagnóstico e a identificação dos diferentes sub-tipos da doença.

Para a pesquisa destes autoanticorpos são utilizadas lâminas de mosaico hepático, que contêm diferentes cortes de tecidos: fígado, rim, estômago e ainda células VSM47 (*Vascular smooth muscle cell line*). Este mosaico apresenta um largo espectro de antigénios, permitindo um diagnóstico mais preciso e dirigido, devido à utilização simultânea dos diferentes tipos de tecidos permite a deteção vários autoanticorpos relevantes na doença hepática nomeadamente: anticorpos anti-mitocôndrias (AMA), anticorpos anti-nucleares (ANA), anticorpos anti-microsomas renais-hepáticos tipo I (anti-LKMI), anticorpos anti-músculo liso (ASMA), anticorpos anti-F-actina, anticorpos anti-células parietais gástricas (APCA), entre outros.

A hepatite autoimune do tipo I é caracterizada pela presença de ANA e ASMA enquanto que a hepatite autoimune do tipo 2 é caracterizada tipicamente por anti-LKMI.

O mosaico hepático permite ainda a identificação de anticorpos anti-células parietais gástricas, auxiliando assim o diagnóstico de gastrite autoimune.

#### a) Anticorpos anti-nucleares (ANA)

Os ANA podem ser observados em todos os cortes de tecidos e nas células VSM47, sendo que na maioria dos casos apresentam um padrão homogéneo sobretudo no fígado.

A presença de ANA é característica de várias doenças autoimunes como LES, síndrome de Sjogren e esclerose sistémica. No entanto também podem ser encontrados,

em títulos baixos, em pacientes com: hepatites virais, hepatites induzidas por drogas e hepatite alcoólica e não-alcoólica. Por isso, os ANA não são considerados marcadores específicos de hepatite autoimune, pois ainda não é claro como é que estes anticorpos desencadeiam esta patologia (Sebode *et al.*, 2018).

### **b) Anticorpos anti-músculo liso (ASMA)**

Os anticorpos anti-músculo liso, são considerados marcadores de hepatite autoimune do tipo I quando a sua especificidade é anti-F-actina. No estômago estes anticorpos apresentam fluorescência na camada muscular e lâmina própria enquanto que no fígado apresentam fluorescência nas paredes arteriais. No rim os padrões de fluorescência vascular/glomerular e vascular/glomerular/tubular são mais específicos de hepatite autoimune do que o padrão vascular. Nas células VSM47 os filamentos de actina atravessam a célula de um lado ao outro, passando sobre o núcleo (Sebode *et al.*, 2018).

### **c) Anticorpos anti-LKMI**

Na IFI, os anticorpos anti-LKMI apresentam fluorescência no citoplasma dos hepatócitos com ausência de fluorescência nos núcleos, no rim apenas há fluorescência nos túbulos renais proximais e há ausência de fluorescência nas células do estômago. Os anticorpos anti-LKMI são específicos da hepatite autoimune do tipo 2 e têm vários antígenos alvo: citocromo CYP2D6, P450 e 2D6 (Sebode *et al.*, 2018).

Os anticorpos anti-LKMI podem estar presentes em alguns pacientes com infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C, pois este vírus pode ter um papel no desenvolvimento de doenças autoimunes (Sebode *et al.*, 2018).

### **d) Anticorpos anti-mitocôndrias (AMA)**

Os anticorpos anti-mitocôndrias são os marcadores mais específicos e sensíveis de cirrose biliar primária. Existem diversos antígenos mitocôndrias, no entanto apenas os anticorpos anti-M2 são específicos desta patologia, nomeadamente os anticorpos anti-complexo piruvato desidrogenase (AMA-M2) e anticorpos anti-subunidade E2 das  $\alpha$ -2-oxoácido desidrogenases (AMA-M2-3E) (Sebode *et al.*, 2018).

A presença de AMA pode ser observada em todos os cortes de tecido, assim como nas células VMS47, observando-se uma fluorescência granular do citoplasma.

Nos pacientes com suspeita de cirrose biliar primária persistente e com ausência de AMA, deve-se realizar a pesquisa de autoanticorpos anti-sp100 quando se observa o padrão de pontos nucleares. Por outro lado também se pode realizar a pesquisa de anti-gp210 quando se observa um contorno nuclear descontínuo na IFI das células Hep-2. A presença de gp-210 tem sido associada um prognóstico desfavorável na cirrose biliar primária, com uma incidência elevada de carcinoma hepatocelular (Sebode *et al.*, 2018).

#### **e) Anticorpos anti-células parietais gástricas (APCA)**

A gastrite auto-imune é uma doença inflamatória crônica da mucosa gástrica que pode evoluir para anemia perniciosa, uma vez que a produção de fator intrínseco está alterada. O fator intrínseco é co-fator na absorção de vitamina B12 (Rusak *et al.*, 2016).

O alvo para os APCA é a bomba de prótons gástrica H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase situada na membrana das células parietais (Rusak *et al.*, 2016).

Estes autoanticorpos são identificados por IFI quando utilizado o substrato de tecido do estômago. A fluorescência localiza-se no citoplasma das células parietais gástricas, sendo mais intensa no pólo apical das células pois é onde se localiza a bomba de prótons H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Rusak *et al.*, 2016).

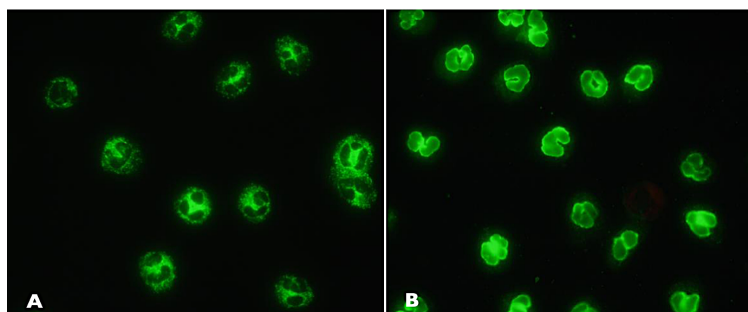
#### **iv. Mosaico Granulócitos**

Este mosaico permite a pesquisa de autoanticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), utilizando como substrato granulócitos fixados em lâminas pelo etanol, formalina ou metanol. Estes autoanticorpos são direcionados predominantemente contra proteínas citoplasmáticas dos neutrófilos. Os ANCA são biomarcadores no diagnóstico de vasculites (inflamação sistêmica e necrose dos vasos sanguíneos) (Suwanchote *et al.*, 2018).

Na IFI os ANCA podem apresentar dois padrões. O padrão citoplasmático (cANCA) é detetado pela fluorescência no citoplasma dos neutrófilos (Figura 8) e está relacionado normalmente com a presença de autoanticorpos anti-Proteínase 3 (PR3). A PR3 é armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. O segundo padrão é perinuclear (pANCA), apresentando fluorescência em torno do núcleo multi-lobulado dos neutrófilos (Figura 8). Este padrão é maioritariamente devido a autoanticorpos anti-Mieloperoxidase (MPO), no entanto também pode ser devido a outros autoanticorpos, nomeadamente a

elastase, lactoferrina, lisozima, H-lamp-2, defensina, entre outros. A MPO encontra-se nos grânulos azurófilos e apresenta atividade bactericida (Suwanchote *et al.*, 2018).

De acordo com o padrão observado dos ANCA por IFI, procede-se à identificação de PR3 e MPO pela metodologia de FEIA. O padrão cANCA anti-PR3 encontra-se sobretudo em pacientes com Granulomatose de Wegener, enquanto que o pANCA anti-MPO se encontra associado a Síndrome de Churg-Strauss e Poliangeite microscópica (Suwanchote *et al.*, 2018).



**Figura 8** - Padrões de fluorescência dos ANCA por IFI. Padrões típicos observáveis dos ANCA: padrão cANCA (A) e o padrão pANCA (B) (Adaptada de (Suwanchote *et al.*, 2018)).

#### 4.2.3 Radioimunoensaios (RIA)

Na técnica de RIA é necessário a amostra (soro) que contem o antígeno de interesse, um anticorpo complementar e uma versão do antígeno marcado radioativamente com Iodo<sup>125</sup> ( $I^{125}$ ). A amostra é incubada com o anticorpo, levando à formação do complexo antígeno-anticorpo. De seguida o antígeno marcado radioativamente é adicionado, e vai competir com o antígeno da amostra libertando-o do anticorpo. Quanto mais antígeno estiver presente na amostra, menos antígeno radioativo tem a capacidade de se ligar ao anticorpo. Pode ser adicionado um segundo anticorpo que se liga ao anticorpo primário, para levar à floculação da solução e permitir a separação do anticorpo primário da solução. Uma vez que a solução que contem os complexos antígeno-anticorpo é mais densa do que a que contem o antígeno livre, a centrifugação permite a separação. Como resultado da centrifugação obtém-se um *pellet* que contem o antígeno da amostra ligado/ antígeno radioativo (Grange, Thompson e Lambert, 2014).

A radiação do *pellet* é quantificada num contador de radiação gama, quantificando a quantidade de antígeno radioativo que se ligou ao anticorpo e conseqüentemente a concentração de antígeno na amostra (Grange, Thompson e Lambert, 2014).

Esta metodologia como referida anteriormente, é o *gold standard* para quantificar autoanticorpos anti-dsDNA em pacientes com LES ou quando o *screening* de anti-dsDNA realizado por FEIA é positivo. Para além disso, é utilizado para a quantificação de autoanticorpos característicos da Diabetes *Mellitus* tipo I como os anticorpos anti-insulina e anticorpos anti-tirosina fosfatase (IA2), e na quantificação de autoanticorpos anti-recetor de acetilcolina na Miastenia Gravis.

#### **4.2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

No laboratório de autoimunidade é utilizada a metodologia de ELISA indireta nos equipamentos automatizados: *Analyzer I* (Euroimmun) e no *Mago* (Erba Mannheim). Esta metodologia, tal como as outras metodologias imunoenzimáticas baseia-se na formação e deteção de complexos antígeno-anticorpo, com auxílio de anticorpos conjugados com enzimas. Quando o substrato cromogéneo da enzima é adicionado, origina um produto com coloração que é medido por espectrofotometria.

O antígeno de interesse está fixado à fase sólida (poço da microplaca). O soro do paciente é adicionado e incuba com o antígeno fixado na fase sólida. Após a incubação é efetuada uma lavagem para remoção do excesso de anticorpo que não ligou ao antígeno. Adiciona-se o anticorpo secundário com especificidade para imunoglobulinas humanas, conjugado com uma enzima (exemplo: fosfatase alcalina). O anticorpo secundário que não ligou ao anticorpo primário presente na amostra, é removido por lavagem. Adiciona-se o substrato da enzima que origina uma cor, que é quantificada por espectrofotometria (Grange, Thompson e Lambert, 2014).

O método de ELISA indireto no laboratório, é utilizado para pesquisa de anticorpos anti-Histonas, anti-M2 total, anti-Cardiolipinas e anti- $\beta$ 2-Glicoproteína.

#### **4.2.5 Quimioluminescência**

Esta metodologia, no laboratório de autoimunidade é efetuada no equipamento *BIO-FLASH* (Inova Diagnostics). A quimioluminescência é utilizada como teste de *screening* para anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA7): SSA/Ro60, SSB/La, Sm, nRNP, Scl-70, Jo-1 e Ro52, que são marcadores importantes para várias doenças reumáticas sistémicas, e autoanticorpos anti-fosfolípidicos: anti-Cardiolipinas e anti- $\beta$ 2-Glicoproteína, envolvidos no Síndrome Anti-fosfolípídico.

A técnica de quimioluminescência neste equipamento consiste em esferas revestidas com o antígeno alvo que vão capturar o autoanticorpo de interesse presente na amostra. Para detetar o autoanticorpo é utilizado um anticorpo conjugado com aminobutililuminol (ABEI), um derivado do luminol. Este anticorpo conjugado com ABEI é capturado pelas esferas e exposto a um pH elevado, ao oxidante peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e a um catalisador, produzindo um *flash* de luz. A leitura é feita por um luminómetro em Unidades de Luz Relativa (RLUs). As RLUs são proporcionais à quantidade de conjugado que se ligou ao anticorpo, ou seja, que são proporcionais à quantidade de autoanticorpos que se ligaram aos antígenos alvo acoplados às esferas (Mahler *et al.*, 2016).

## 5. Microbiologia

A microbiologia é uma das áreas menos automatizada nos laboratórios de análises clínicas, apesar de já existirem diversos equipamentos automatizados, é a área que depende mais dos profissionais de saúde. É dividida na Bacteriologia, Serologia, Virologia, Parasitologia e Micologia.

Aqui são recebidos vários produtos biológicos das diversas áreas médicas sendo que, o processamento da amostra varia consoante o tipo de amostra. A sua finalidade é verificar se existe algum agente patogénico passível de provocar infeção, e se existir, identificá-lo e realizar o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA).

Ao longo do dia, há um grande fluxo de amostras, sendo o sangue e a urina as mais comuns. No entanto também se recebe várias amostras do aparelho respiratório inferior (expetorações, lavados e aspirados brônquicos...), exsudatos, líquidos cefalorraquidianos (LCR), amostras biliares e biópsias.

Durante os dois meses que estive a realizar estágio neste sector, tive a oportunidade de integrar a rotina do laboratório de Microbiologia e compreender como são processadas as diferentes amostras, executar algumas das técnicas utilizadas (técnicas de sementeira, observação microscópica e realização de antibiogramas manuais) e interpretar os resultados obtidos numa dada situação clínica. A compreensão da dinâmica laboratorial é fundamental na interpretação e validação dos resultados obtidos.

## **5.1 Bacteriologia**

A maioria das infecções nosocomiais estão associadas com procedimentos cirúrgicos ou dispositivos médicos invasivos, sendo que a maioria destas infecções tem como agente etiológico as bactérias. As infecções do trato respiratório e da corrente sanguínea são as mais letais, no entanto as infecções do trato urinário são as mais comuns. Assim, hoje em dia a bacteriologia clínica assume um papel central no laboratório de análises clínicas não só no diagnóstico destas infecções mas também no tratamento, pois as resistências à antibioterapia continuam a aumentar (Peleg e Hooper, 2010).

### **5.1.1 Amostras biológicas**

#### **i. Urina (uroculturas)**

A urina é uma das amostras mais comuns. A urina inibe alguns dos microrganismos que colonizam normalmente a uretra, devido ao baixo pH e concentrações elevadas de ureia presentes na urina. No entanto, as infecções urinárias são das infecções mais comuns tanto na comunidade como a nível hospitalar (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016; Tille, 2017).

Existem fatores que levam ao aparecimento de infecções do trato urinário (ITU), nomeadamente a anatomia da mulher. A mulher tem a uretra mais curta e mais próxima da região perianal que é colonizada por muitos microrganismos, facilitando assim a entrada destes microrganismos, alterações hormonais associadas à gravidez e à menopausa, assim como o uso antibioterapias. As ITU são assim, mais comuns nas mulheres e nos homens a partir dos 60 anos, quando há um aumento da próstata, que interfere com a remoção da urina da bexiga (Tille, 2017).

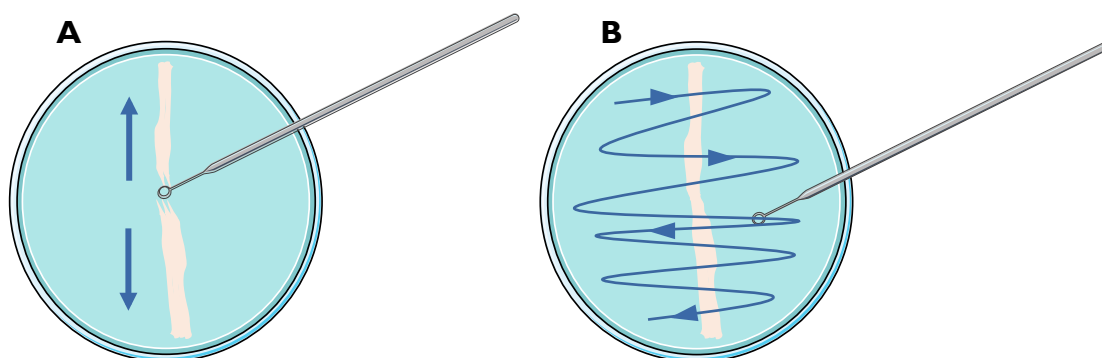
Quando se suspeita de ITU, realiza-se uma colheita de urina, descartando-se o primeiro jato de urina, devido às bactérias que colonizam a uretra e que são arrastadas durante o processo de micção (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016). Pode-se obter amostras de diversas formas, nomeadamente por nefrostomia, saco coletor (em crianças), punção de cateter ou suprapúbica ou mais comumente, colheita do jato intermédio da primeira urina da manhã. A colheita deve ser feita para um contentor esterilizado em condições de assepsia. Se a amostra não poder ser cultivada de imediato coloca-se num tubo com ácido bórico, um agente bacteriostático, ou seja, que impede a multiplicação bacteriana (Lum e Meers, 1989; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).



Na cultura são utilizados dois tipos de meios. A gelose Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos (CLED), um meio diferencial não seletivo que permite distinguir as bactérias que fermentam a lactose e as que não fermentam a lactose através da alteração da cor do meio e para além disso, é um meio que inibe o *swarming* do *Proteus* spp. devido à sua deficiência em eletrólitos (Muñoz *et al.*, 1992). A gelose de sangue (GS), é um meio de enriquecimento que permite o isolamento e discriminação de diferentes espécies bacterianas e leveduras. (Aspevall *et al.*, 2002). A GS permite ainda observar se há hemólise e qual o tipo de hemólise, uma característica importante na identificação de alguns microrganismos.

Na inoculação dos meios, utilizam-se ansas descartáveis calibradas de 1 µl, através da técnica representada na Figura 9. Esta técnica permite obter colónias isoladas para se poder realizar uma análise quantitativa das unidades formadoras de colónias (UFCs). As placas são incubadas a 37°C durante 18-24h (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016). Após o período de incubação verifica-se se houve crescimento microbiano nas placas e procede-se à avaliação quantitativa das culturas.

As uroculturas permitem quantificar os microrganismos presentes na urina, sendo importante discriminar colonização, infeção e contaminação (Tille, 2017).



**Figura 9** - Técnica utilizada para a inoculação de urina.

O inóculo é colocado no centro da placa e espalhado numa linha ao longo do diâmetro da placa com uma ansa (A), de seguida com a mesma ansa fazem-se estrias ao longo de toda a placa, cruzando a região do primeiro inóculo varias vezes para produzir colónias isoladas (B).

A avaliação das uroculturas é feita com base no crescimento bacteriano: negativo, positivo ou urina contaminada (Tabela 5). Esta avaliação é feita através da observação macroscópica da morfologia das colónias.

**Tabela 5** - Critérios de avaliação do crescimento microbiano das uroculturas.

Na tabela correlaciona-se a avaliação das uroculturas com o crescimento microbiano. Na avaliação das uroculturas é muito importante fazer a distinção entre infecção e contaminação, tendo em conta o tipo de amostra de urina (nefrostomia, saco coletor, punção de cateter ou suprapúbica ou jato intermédio da primeira urina da manhã).

Crescimento microbiano (UFC/ml)	Avaliação das uroculturas
<b>Ausência de crescimento</b>	Negativo
$\leq 10^4$	I tipo de colónia: valorização do microrganismo presente de acordo com a informação clínica (Grávidas, Transplantados,...)
$>10^4 - <10^5$	Observação de I tipo de colónia procede-se à identificação e TSA. Observação de I tipo de colónia: identificação de TSA.
$\geq 10^5$	I tipo de colónia: identificação e TSA. 2 tipos de colónias: repicar para GS se coco Gram positivo e para CLED se bacilo Gram negativo.
<b>Urina contaminada</b>	Observação de > 2 tipos de microrganismos

As culturas que forem consideradas positivas, são sujeitas ao processo de identificação do(s) microrganismo(s) presentes e se necessário, ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA).

## ii. Sangue (hemoculturas)

O sangue é um fluido biológico estéril. Por isso, a presença de microrganismos neste fluido constitui uma grande preocupação, a septicémia. A septicémia é uma doença grave, que está associada a uma morbilidade e mortalidade elevada (Hall e Lyman, 2006)(Lee et al., 2013). As hemoculturas são essenciais para o seu diagnóstico (Lee et al., 2013).

Para detetar infeções na corrente sanguínea, realiza-se uma punção venosa em condições de assepsia (ou seja, depois de desinfetar a região da pele onde se faz a punção, evitando assim a microbiota da pele) permitindo evitar falsos positivos (Hall e Lyman, 2006). Para se obter uma boa sensibilidade, no mínimo deve-se realizar duas hemoculturas por doente, uma vez que o microrganismo em causa pode não estar presente constantemente na corrente sanguínea (Lee et al., 2007).

As amostras de sangue chegam ao laboratório previamente inoculadas nos frascos de hemocultura, que são depois incubados, a 37°C no sistema BacT/ALERT 3D. Este sistema de hemoculturas permite a monitorização contínua das amostras para a deteção de bacteriémia

e fungemia, agitação permanente e detecção de crescimento microbiano (Bourbeau *et al.*, 1998)(Madigan *et al.*, 2012). A detecção é feita através da produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que é produzido pelo metabolismo dos microrganismos. No fundo dos frascos encontra-se um sensor fluorescente permeável a gases, o CO<sub>2</sub> difunde no sensor e dissolve-se na água presente na matriz do sensor, consequentemente, são produzidos íons de hidrogênio (H<sup>+</sup>). A acidificação do meio leva à diminuição do pH, que por sua vez aumenta a produção de fluorescência do sensor (Tille, 2017).

O meio nos frascos de hemocultura permitem também recuperar bactérias fastidiosas, leveduras e eliminar interferência dos antibióticos. Estes frascos contêm o meio líquido *Brain-heart infusion* (BHI) com resinas que absorvem e inativam os agentes antimicrobianos, fatores do complemento ou citocinas (Lee *et al.*, 2013).

Quando o sistema deteta crescimento bacteriano, a hemocultura é considerada positiva. A partir da hemocultura positiva faz-se um esfregaço para coloração de Gram (Anexo I) e uma repicagem para uma GS, que vai incubar durante 24-48h a 37°C. Na GS, a amostra é semeada pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido (Figura 10). Após o período de incubação faz-se a avaliação das culturas e procede-se à identificação do microrganismo. No entanto, hemoculturas positivas nem sempre são sinónimo de septicémia uma vez que, pode ter ocorrido contaminação da amostra durante a colheita por microrganismos comensais da pele nomeadamente por *Staphylococcus* spp. coagulase negativa.



**Figura 10** - Técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido, para obtenção de colónias isoladas.

Se ao fim de 5 dias, não for detetado crescimento microbiano nos frascos de hemocultura as amostras são consideradas negativas, contudo o período de incubação pode ser alargado dependendo da situação clínica do paciente.

### iii. Pontas de cateter

Em ambiente hospitalar é normal a utilização de dispositivos médicos invasivos, nomeadamente os cateteres venosos centrais, constituindo assim uma porta de entrada para possíveis agentes patogénicos. Quando as hemoculturas são positivas e os doentes possuem este tipo de cateter, este é removido e enviado ao laboratório, uma vez que pode ser a origem da septicémia.

As pontas de cateter podem ser diretamente roladas na GS ou colocadas em meio BHI (repicado para GS ao fim de 24h).

### iv. Exsudatos vaginais

A microbiota vaginal tem um papel muito importante na defesa contra as infeções, excluindo competitivamente os microrganismos que poderiam causar infeção (Ma, Forney e Ravel, 2012). As bactérias que constituem a microbiota vaginal, produzem ácido láctico que inibe o crescimento de bactérias patogénicas através do pH ácido, moléculas antimicrobianas e bacteriocinas. Numa microbiota saudável as espécies predominantes são os *Lactobacillus* spp. (Lewis, Bernstein e Aral, 2017).

Existem vários determinantes na composição da microbiota vaginal nomeadamente os níveis de estrogénio, dieta e tabagismo (Lewis, Bernstein e Aral, 2017). As infeções do trato genital podem ser devido a desequilíbrios da microbiota genital normal ou por transmissão sexual (Tille, 2017).

Estes exsudados chegam ao laboratório em zaragatoas em meio de transporte que mantêm a viabilidade de qualquer organismo que possa estar presente até a amostra ser processada (Barber, Lawson e Grove, 1998). Estas amostras são semeadas em GS, Agar Columbia Ácido Nalidíxico (CNA) e meio Neisseria (NEISS) utilizando a técnica representada na Figura 10. Para além disso, é feito um esfregaço para observação microscópica para coloração de Gram. A sua observação permite uma caracterização da microbiota vaginal (observação de células epiteliais, leucócitos e *clue cells*). As *clue cells* são células epiteliais cobertas com vários cocobacilos com Gram variável, sugestivas de vaginose bacteriana por *Gardnerella vaginalis* (Tille, 2017).

Nos exsudatos vaginais, pode-se ainda pesquisar *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* e *Streptococcus agalactiae*.

*Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. têm sido associados a diversas infeções em adultos e crianças, que podem ser responsáveis por uretrites não-gonocócicas, cervicites,

doença pélvica inflamatória e alterações durante a gravidez (D’Inzeo *et al.*, 2017). A pesquisa destes microrganismos é feita através de um *kit* comercial. Estes testes têm por base o método de cultura, identificação bioquímica, e o TSA. Após 24-48h a 37°C efetua-se a leitura da galeria por alteração de cor das cúpulas onde se inoculou a amostra. Estas cúpulas contêm substratos que permitem detetar a atividade enzimática ou a fermentação de açúcares pelos microrganismos inoculados.

Algumas mulheres são colonizadas por *Streptococcus agalactiae* (~~*S. agalactiae*~~), que pode causar infeção em recém-nascidos: septicémia ou meningite. Uma vez que estas infeções são adquiridas durante o parto, faz-se um rastreio pré-natal das mulheres que estão colonizadas por esta bactéria, reduzindo assim a incidência destas infeções (Buchan *et al.*, 2015). Neste momento, no laboratório a pesquisa de *S.agalactiae* é feita através da técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real (GeneXpert®). Este sistema permite a preparação automática da amostra, amplificação dos ácidos nucleicos e deteção de sequências alvo específicas, num sistema fechado (Buchan *et al.*, 2015; Goldenberg *et al.*, 2012).

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* é realizada em simultâneo, através da técnica de PCR em tempo real (GeneXpert®). Estas bactérias são responsáveis pelas doenças sexualmente transmissíveis mais frequentes (Tille, 2017).

#### **v. Exsudatos oculares**

A incidência de infeções oculares tem aumentado, sobretudo devido ao uso de lentes de contacto e cirurgias oculares. O diagnóstico microbiológico é essencial quando as lesões não são específicas, infeções recorrentes ou não respondem à terapêutica, uma vez que estas infeções podem resultar na perda irreversível da visão (López-Cerero, Etxebarria e Mensa, 2009).

Estes exsudatos chegam ao laboratório já inoculados nos meios agar chocolate PolyVitex (PVX), GS, Sabouraud com cloranfenicol (SaCl) e com um esfregaço para realizar coloração de Gram. O meio SaCl é destinado ao isolamento de fungos, sendo que o cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias contaminantes (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

#### **vi. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)**

O diagnóstico de infeções que envolvem o sistema nervoso central (SNC) são consideradas uma emergência médica. O SNC é constituído pela espinal medula e cérebro.

As meninges (pia-máter, aracnóide e dura-máter) revestem estas estruturas. Assim, o LCR que circula no espaço subaracnóideo (entre a pia-máter e a membrana aracnóide) pode fornecer informações cruciais sobre possíveis infecções no SNC (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016; Tille, 2017).

O LCR é colhido por punção lombar para um recipiente estéril e transportado para o laboratório o mais rápido possível.

A amostra é concentrada por centrifugação. Do sedimento obtido inocula-se os meios PVX, GS e BHI pela técnica de inundação e realiza-se um esfregaço para observação microscópica para coloração de Gram. Todos os meios são incubados a 37°C durante 48-72h, pois pode haver crescimento de microrganismos fastidiosos como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*.

#### **vii. Líquido sinovial, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido pericárdico**

As cavidades corporais contêm pequenas quantidades de fluido, que banham os órgãos e as membranas, reduzindo assim a fricção entre os órgãos. Estes fluidos em condições normais são estéreis, portanto qualquer microrganismo potencialmente patogénico pode ser significativo. A quantidade de fluido nestas cavidades pode aumentar em resposta a um processo infeccioso (Tille, 2017).

Quando algum destes produtos chegam ao laboratório, realiza-se sempre um esfregaço para realizar coloração de Gram e inocula-se a amostra nos respetivos meios de cultura. O líquido sinovial, líquido pleural e líquido pericárdio são inoculados em BHI. O líquido peritoneal é inoculado no meio *Cooked meat* (CM). Estes meios são incubados durante 24-48h. A coloração de Gram permite orientar para que meios de cultura se faz a repicagem e que tipo de microrganismos estão presentes, nomeadamente se são bactérias aeróbias ou anaeróbias.

Para realizar a pesquisa de bactérias anaeróbias, as amostras devem ser transportadas num frasco Portagerm™, que contem um meio de transporte que permite manter as condições de anaerobiose (Tille, 2017). As amostras são semeadas nos meios Ágar Kanamicina-Vancomicina com 5% sangue de ovelha (Schaedler-KV), Ágar Columbia com Hemina e Vitamina K (HK) e meio Anaeróbios NE. Estes meios têm características que favorecem o crescimento de bactérias anaeróbias, tais como a hemina e a vitamina K para alguns anaeróbios estritos, a kanamicina inibe bacilos Gram negativos anaeróbios facultativos e a vancomicina inibe bactérias Gram positivas (Gibbons e Macdonald, 1960; Murray,

Rosenthal e Pfaller, 2016). No meio HK é colocado um disco impregnado com o antibiótico netilmicina, que permite verificar a presença de bactérias anaeróbias uma vez são intrinsecamente resistentes à netilmicina (aminoglicosídeo), ou seja, se houver crescimento poderão ser bactérias anaeróbias (Bryan, Kowand e Elzen, Van den, 1979).

As placas são incubadas durante 48h a 37°C, numa câmara de anaerobiose. Na câmara coloca-se um controlo interno (uma tira impregnada com bactérias estritamente aeróbias) permitindo verificar se as condições de anaerobiose estão presentes.

No líquido sinovial obtido de articulações inflamadas pode-se realizar ainda a pesquisa de cristais, através da microscopia de luz polarizada (e das características de birrefringência dos cristais) (Lumbreras *et al.*, 2005). Esta pesquisa é feita com a objetiva de 40x, sendo que os principais cristais observados são os de urato monossódico responsáveis pela gota.

### **viii. Exsudatos de feridas e pus de abscessos**

Os exsudatos de feridas são colhidos com zaragoas e colocados num meio de transporte. Enquanto que os pus de abscesso, são normalmente colhidos por aspiração.

Ambas as amostras são semeadas em GS pela técnica descrita na Figura 2 e realizado um esfregaço para efetuar coloração de Gram, no entanto o pus também é inoculado em CM. Após incubação 24-48h a 37°C, conforme o que se é observado tanto na cultura como no esfregaço, pode-se fazer repicagens da primo-cultura para outros meios, de forma a isolar o(s) microrganismo(s) pretendido(s).

No caso dos pus, pode-se realizar a pesquisa de bactérias anaeróbias se vierem em frasco Portagerm™ uma vez que, nestas amostras é comum a presença de anaeróbios.

### **ix. Amostras do trato respiratório**

Quando se suspeita de infeções do trato respiratório, as amostras que chegam ao laboratório são sobretudo aspirados e lavados brônquicos (obtidos por métodos invasivos) e amostras de expetoração.

A expetoração é a amostra do trato respiratório mais comum, contudo é frequentemente contaminada por saliva e microbiota comensal do trato respiratório superior (Tille, 2017). Por este motivo, deve-se avaliar a qualidade desta amostra, através da relação entre o número de célula epiteliais e número de leucócitos (Tabela 6). As amostras que contenham sobretudo material do trato respiratório superior devem ser rejeitadas. Esta avaliação é feita através de um esfregaço para coloração de Gram. As amostras de

expetoração e aspirados brônquicos são inoculadas em GS e meio Haemophilus (HAE), pela técnica descrita na Figura 10 e incubadas a 37°C na estufa.

**Tabela 6** - Critérios de avaliação da qualidade das amostras de expetoração segundo os critérios de Murray e Washington.

As amostras que devem ser processadas são as que se inserem nos grupos 4 e 5, pois são as que apresentam boa qualidade para o exame bacteriológico porque têm poucas células epiteliais, ou seja, pouca saliva. Devem ser observados pelo menos 10 campos na objetiva de pequena ampliação (10x) (Adaptado de (Fonseca *et al.*, 2004)).

Qualidade da amostra	Células epiteliais/campo	Leucócitos/campo
<b>Grupo 1</b>	25	10
<b>Grupo 2</b>	25	10-25
<b>Grupo 3</b>	25	25
<b>Grupo 4</b>	10-25	25
<b>Grupo 5</b>	<10	25

Os lavados brônquicos são inoculados em GS e PVX pela técnica mesma técnica que as restantes amostras do trato respiratório e incubados a 37°C na estufa.

Nos doentes portadores de fibrose quística, doença pulmonar obstrutiva crónica e bronquiectasias as amostras de expetoração são inoculadas em GS, HAE, SaCl e meio seletivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA), uma vez que estes doentes são mais suscetíveis a desenvolver infeções respiratórias bacterianas mais frequentemente.

Em todas as amostras do trato respiratório se avalia a flora através de um esfregaço corado por coloração de Gram.

Todas as amostras de expetoração são avaliadas ao fim de 24-48h, no entanto para os aspirados e lavados brônquicos são necessárias 48h para se poder dar um resultado. Quando se suspeita de fungos filamentosos as placas podem ser incubadas por um período mais longo (até uma semana).

#### x. **Biópsias**

As biópsias devem ser dissecadas em pequenos fragmentos, com ajuda de um bisturi e colocados no meio BHI, GS e SaCl. Quando é possível, realiza-se um esfregaço para coloração de Gram.

Normalmente nas biópsias gástricas faz-se a pesquisa de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Neste caso, as amostras são semeadas num meio seletivo para *H. pylori* e incubadas em atmosfera microaerofílica a 37°C. Após incubação pode-se realizar provas bioquímicas



complementares à cultura, como o teste da urease e teste da catalase. A coloração pela técnica de Gram do fragmento da biópsia pode ajudar na identificação desta bactéria.

## xi. Fezes

O trato gastrointestinal contém uma vasta e diversa flora microbiota. Esta auxilia na manutenção do equilíbrio do estado fisiológico do hospedeiro e fornecendo vitaminas e nutrientes essenciais assim como influencia a resposta imunitária (Tille, 2017).

As gastroenterites são infeções comuns, que podem causar elevada morbidade e mortalidade, principalmente em crianças e idosos, contudo a maioria dos síndromes diarreicos agudos são auto-limitados e por isso apenas uma pequena fração de pessoas infetadas precisa de um diagnóstico clínico (Tille, 2017).

Na coprocultura normalmente é realizada a pesquisa de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp., no entanto também se podem realizar a pesquisa de outros enteropatógenos como *Yersinia* sp., *Campylobacter* sp. e a toxina de *Clostridium difficile* (*C.difficile*) caso seja solicitado pelo clínico.

A pesquisa de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. é feita simultaneamente. As amostras são inoculadas nos meios Hektoen, Salmonella Shigella Agar (SS) e no Caldo de Bacilos Gram negativo (CB). O CB é repicado ao fim de 8h para o meio Hektoen e SS. Os meios são incubados a 37°C durante 18-24h.

O CB contém sais biliares que atrasam o crescimento da maioria das *Enterobacteriaceas* presentes no trato gastrointestinal e manitol como fonte primária de energia, sendo que o manitol não é muito utilizado por microrganismos entéricos não patogénicos, favorecendo assim os patogénicos entéricos. O meio Hektoen permite o isolamento destes microrganismos uma vez que contém sais biliares. Para além disso tem um indicador de pH (fucsina ácida e azul de bromotimol) que permite diferenciar bactérias fermentadoras (colónias amarelas) e não fermentadoras da lactose (colónias verdes a azuis), sendo que *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. não fermentam a lactose. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico amoniacal presentes no meio, permitem ainda a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) produzido pela *Salmonella* sp., distinguindo-a de *Shigella* sp. (Tille, 2017).

A pesquisa de *Yersinia enterocolitica* é feita por inoculação no meio seletivo Yersinia, que deve ser incubado durante 48h para permitir o desenvolvimento das colónias típicas (colónias rosa escuras no centro e mais translúcidas nos bordos) (Tille, 2017).

A pesquisa de *Campylobacter* sp. é feita por inoculação no meio seletivo Campyloset, que posteriormente é incubado a 42°C em atmosfera microaerofílica durante 24-48h.

A prevalência de infecções nosocomiais por *Clostridium difficile* tem aumentado, por isso é necessário proceder a um diagnóstico rápido e preciso. A pesquisa de *C.difficile* é realizada através da detecção dos genes responsáveis pela produção das toxinas. Estes genes são detetados através de *primers* dirigidos, utilizando o GeneXpert®, providenciando assim uma grande sensibilidade e rapidez no diagnóstico (Shin et al., 2012).

### 5.1.2 Identificação

No laboratório, a identificação definitiva do(s) microrganismo(s) presentes nas culturas é feita através de *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS). Esta técnica permite a identificação da maior parte dos microrganismos: bactérias aeróbias, bactérias anaeróbias e leveduras (Wieser et al., 2012).

A partir de uma cultura pura é retirada uma porção da colónia que é diretamente aplicada num poço de um *slide*, sendo a amostra misturada com uma matriz química. O laser é aplicado à matriz juntamente com a amostra, resultando num processo de ionização. Os iões são acelerados e separados no tubo de voo em vácuo. No tubo de voo é medido o tempo de voo, sendo que os iões mais leves viajam mais rápido no tubo (Lee et al., 2015; Tille, 2017).

Em cada *slide*, por cada 16 amostras é colocado um controlo de qualidade interno (estirpes ATCC), sendo que no máximo cada *slide* tem 3 controlos. Estes controlos garantem a qualidade e reprodutibilidade do ensaio.

Esta técnica utiliza a razão massa-carga e a intensidade do sinal gerado de várias moléculas que são ionizadas da amostra cristalizada por pulsos laser. Os microrganismos são identificados através da comparação do espectro de proteínas obtido do MALDI-TOF MS com uma base de dados de referência, e o resultado é dado com um valor de confiança que corresponde à precisão obtida pela comparação entre os espectros (Lee et al., 2015).

O MALDI-TOF MS permite com apenas uma porção da colónia isolada a identificação do microrganismo num tempo reduzido, possibilitando um tratamento dirigido para os doentes.

### 5.1.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo laboratório é importante para confirmar suscetibilidades e detetar possíveis resistências dos antimicrobianos (Jorgensen e Ferraro, 2009).

Após identificação do microrganismo realiza-se o TSA, cuja interpretação tem como base as normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

A maioria dos antibiogramas são feitos pelo equipamento automatizado VITEK 2<sup>®</sup>, que utiliza cartas de suscetibilidade de acordo com o microrganismo (Tabela 7).

**Tabela 7** - Cartas de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizadas no VITEK 2<sup>®</sup>.

As cartas de suscetibilidade utilizadas são em função do microrganismo identificado. Prepara-se uma suspensão bacteriana, cuja a turvação McFarland depende do tipo de carta de suscetibilidade.

Cartas de suscetibilidade utilizadas no VITEK 2 <sup>®</sup>	Microrganismos	Turvação MacFarland
<b>AST-NI92</b>	Bacilos Gram negativos (Enterobactérias)	0,55-0,65
<b>AST-N222</b>	Bacilos Gram negativos não fermentadores	0,55-0,65
<b>AST-P576</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,75
<b>AST-P586</b>	<i>Streptococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.	0,55-0,65
<b>AST-P619</b>	<i>Staphylococcus</i> spp.	0,55-0,65
<b>YS07</b>	<i>Leveduras</i>	1,8-2,5

As cartas de suscetibilidade aos antimicrobianos contêm poços com concentrações específicas de antibióticos (Figura 11), nas quais são inoculadas a respetiva suspensão bacteriana. Estas cartas são incubadas no VITEK 2<sup>®</sup> a temperatura controlada, no qual são feitas monitorizações periódicas do crescimento bacteriano por turbidimetria, permitindo obter o valor da concentração mínima inibitória (CMI) (Tille, 2017). O *software* interpreta os padrões de suscetibilidade, suscetível ou resistente, de acordo com as normas estabelecidas pelo EUCAST, assim como os mecanismos de resistência.

Simultaneamente são feitos controlos de crescimento dos microrganismos da suspensão bacteriana, inoculando a suspensão no meio tripticase soja ou no meio tripticase soja suplementado com sangue para microrganismos mais fastidiosos. Este controlo de identificação permite avaliar a pureza da suspensão bacteriana preparada para o antibiograma, caso seja necessário.

Para além dos TSA automáticos realizados no VITEK 2<sup>®</sup>, podem ser realizados TSA manuais. Estes TSA são realizados para bactérias para as quais os resultados no VITEK 2<sup>®</sup> são incoerentes ou quando não existem antibiogramas automáticos definidos.

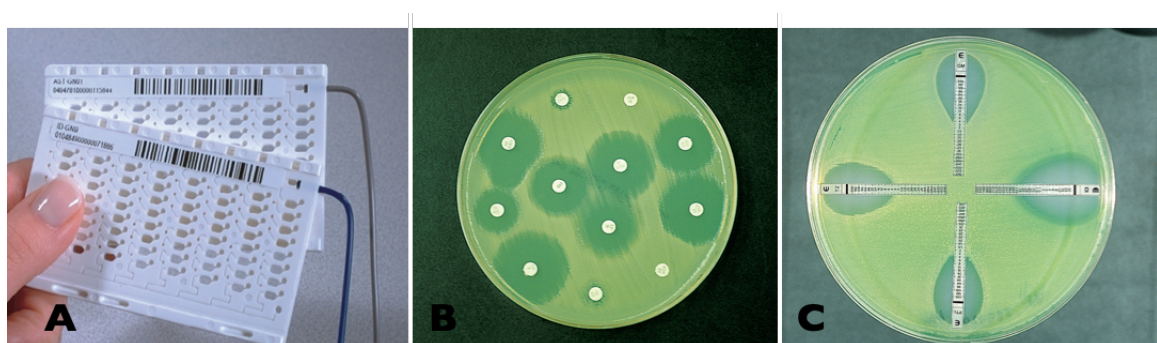
Os antibiogramas manuais são realizados através do método de difusão em disco ou tiras *E-test*. Para estes antibiogramas faz-se uma suspensão bacteriana 0.5 McFarland que é inoculada em meio Muller-Hinton (MH) que pode ser suplementado com 5% sangue para bactérias mais fastidiosas. As placas são incubadas por 16-24h a 37°C, sendo depois realizada a interpretação dos resultados.

O método de difusão em disco consiste na colocação de discos impregnados com concentrações de antibióticos conhecidas nas placas inoculadas, com a respetiva suspensão bacteriana (Figura 11). Os halos de inibição formados em torno dos discos de antibióticos são medidos em milímetros, sendo que, o diâmetro destes halos são interpretados utilizando as regras do EUCAST. Estes resultados são avaliados, na categoria de suscetibilidade como: suscetíveis ou resistentes (Jorgensen e Ferraro, 2009).

Os *E-test* são tiras impregnadas com um gradiente de concentração de antibiótico e estão marcadas com uma escala de concentração (Figura 11). Assim, esta metodologia permite obter resultados quantitativos, uma vez que permite obter a CMI (Jorgensen e Ferraro, 2009).

No caso dos antibiogramas manuais também são realizados controlos de crescimento dos microrganismos da suspensão bacteriana.

A metodologia de referência para determinar a CMI à colistina é o método de microdiluição em caldo. Não devem ser utilizadas outras metodologias, uma vez que as CMI's eram subestimadas para isolados suscetíveis e resistentes, provavelmente devido à dificuldade de difusão da colistina no ágar. A colistina normalmente é apenas utilizada como último recurso no tratamento de infeções provocadas por microrganismos multirresistentes (Matuschek *et al.*, 2018).



**Figura 11** – Metodologias utilizadas nos antibiogramas.

Cartas de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizadas no VITEK 2<sup>®</sup> (A), contêm 64 poços com várias concentrações de antibióticos. Método de difusão em disco (B), os discos impregnados com antibiótico são colocados na superfície do ágar inoculado com a suspensão bacteriana e após o período de incubação é possível observar os halos de inibição formados em torno dos discos. As tiras *E-test* (C) são colocadas na superfície do ágar inoculado com a suspensão bacteriana, após o período de incubação a CMI é onde o halo de inibição intersecta a tira *E-test* (Adaptado de (Tille, 2017)).

## 5.2 Micobactérias

A pesquisa de micobactérias é realizada de forma distinta das restantes bactérias, uma vez que existe um grande risco de se contrair infecção através da inalação de aerossóis. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda a utilização de práticas de biossegurança de nível 2, equipamentos de contenção e manipulações que evitem a formação de aerossóis durante a manipulação das amostras (Tille, 2017).

A pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) pode ser realizada em várias amostras biológicas, como a expetoração, LCR, sangue, urina, lavados e secreções brônquicas de doentes com suspeita de tuberculose (TB). No caso de amostras de expetoração devem ser colhidas 3 amostras em dias consecutivos, uma vez que a dose infetante é muito baixa (10 bactérias) e a emissão de *Mycobacterium* spp. não é contínua. Quando estas amostras chegam ao laboratório têm que ser sujeitas ao processo de descontaminação, liquefação, concentração e homogeneização, utilizando o kit BD BBL™ MycoPrep™.

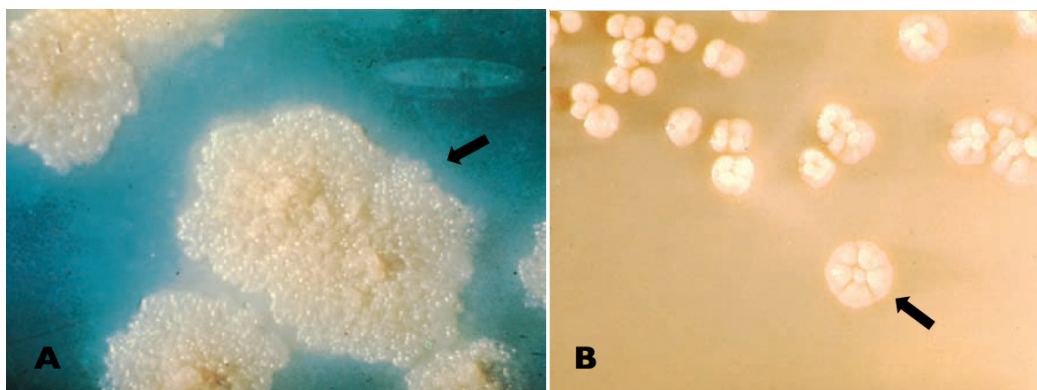
O processo de descontaminação e liquefação é feito através de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), citrato trissódico e N-acetil-L-cisteína (NALC). O NaOH é utilizado como descontaminante e agente mucolítico. O NALC, tal como o NaOH é um agente mucolítico. O citrato de sódio liga iões de metais pesados que possam existir na amostra e que eventualmente possam inativar NALC. As amostras estéreis, como é o caso do LCR não necessitam de realizar este processo, são semeadas diretamente nos meios de cultura. É adicionado o tampão fosfato que estabiliza a amostra, neutralizando a mistura anterior (Tille, 2017).

A concentração e homogeneização é feita por centrifugação a 3000x g /15 minutos e se existirem BAAR vão ficar concentrados no sedimento.

Após este procedimento, inocula-se as amostras no meio líquido *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT™) e no meio sólido Löwenstein-Jensen. Estes meios são incubados a 37°C durante 6 semanas, sendo que MGIT™ é incubado no equipamento BACTEC MGIT 960, que monitoriza e deteta o crescimento bacteriano através do consumo de oxigénio. O tubo MGIT contem o meio líquido Middlebrook 7H9, que é suplementado com MGIT PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidixico, Trimetoprim e Azlocilina) inibindo o crescimento de microrganismos contaminantes, favorecendo assim, o crescimento de micobactérias (Kassaza *et al.*, 2014). Este tubo possui na sua base um composto fluorescente que é sensível à presença de oxigénio, ou seja, quando há multiplicação bacteriana há consumo de oxigénio e conseqüentemente emissão de fluorescência, sendo que a

intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de oxigênio consumido (Tortoli et al., 1999). Após as 6 semanas de incubação, se não houver crescimento microbiano as culturas são dadas como negativas.

O meio Löwenstein-Jensen, é um meio sólido em tubo inclinado, no qual é feita uma leitura semanal, durante 6 semanas. Neste meio o crescimento é mais lento e por isso o seu interesse prende-se sobretudo pela observação macroscópica das colônias que são características de *Mycobacterium* spp. (Figura 12) (Tille, 2017).



**Figura 12** - Aspeto macroscópico de algumas micobactérias no meio sólido Löwenstein-Jensen. Aspeto macroscópico característico de *Mycobacterium tuberculosis* (A), após 8 semanas de incubação. Colônias multilobuladas de *Mycobacterium fortuitum* (B) (Adaptado de (Tille, 2017)).

Para além das culturas, realiza-se um esfregaço para coloração pela técnica de Kinyoun (Anexo 2). O esfregaço pode ser realizado diretamente da amostra ou no sedimento após homogeneização, e na presença de micobactérias estas apresentam-se vermelhas num fundo azul.

Quando há deteção de crescimento no meio MGIT, homogeniza-se o tubo e realiza-se um esfregaço para coloração de Kinyoun a partir deste MGIT. Para além disso, inocula-se uma GS, para verificar se a positividade é devido à presença *Mycobacterium* spp. ou a contaminação por outras bactérias.

### 5.2.1 Identificação de micobactérias

Para realizar a identificação é muito importante a observação macroscópica da morfologia das colônias no caso do meio sólido, assim como a observação microscópica do esfregaço, uma vez auxilia na identificação.

Para a identificação existem diversos testes que podem ser utilizados:

- **Teste imunocromatográfico SD BIOLINE TB Ag MPT64** (Abbott) que detecta o complexo *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M.tuberculosis complex*). Este

teste utiliza anticorpos monoclonais para detectar a proteína MPT64, que é secretada especificamente por bactérias que pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum* e *M.microti*) (Byeon et al., 2015). Este teste realiza-se partir do MGIT™ positivo.

- **PCR em tempo real** para detecção do complexo *M.tuberculosis*. Este PCR é realizado no equipamento Fluorocycler (Hain Lifescience) e utiliza sondas oligonucleotídicas de cadeia simples marcadas com fluoróforos. Se houver hibridização das sondas com o DNA amplificado há um aumento da fluorescência (Erkose et al., 2018).
- **GenoType Mycobacterium** (Hain Lifescience) é baseado da hibridização dos produtos de PCR em tiras de nitrocelulose, que contêm sondas imobilizadas para as diferentes espécies de micobactérias. Os produtos amplificados na reação de PCR só se ligam às sondas (hibridização) após desnaturação química, uma vez que a hibridização só ocorre com amplicons de cadeia de simples. Para a detecção colorimétrica dos amplicons hibridizados, é adicionada estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina e o respetivo substrato. O padrão de bandas obtido na tira permite identificar qual a espécie micobactéria presente na amostra (Richter et al., 2003).

No laboratório são utilizados: GenoType Mycobacterium CM (Common mycobacteria), GenotType Mycobacterium AS (Additional species) e GenoType MTBDRplus.

O GenotType Mycobacterium CM permite a detecção de micobactérias mais relevantes como: *M. tuberculosis complex*, *M. avium subspecies*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, e *M. xenopi*, entre outras (Gitti et al., 2006). O GenotType Mycobacterium AS permite a identificação de 16 micobactérias atípicas, uma vez que estas micobactérias podem causar infeções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, por isso uma identificação rápida apresenta importante relevância clínica (Gitti et al., 2006). O GenoType MTBDRplus detecta o complexo *M.tuberculosis* e resistência aos antibióticos rifampicina e/ou isoniazida. Este teste normalmente é utilizado quando há ineficácia terapêutica devido à presença de multirresistentes (Dorman et al., 2012).

## 5.2.2 Teste de suscetibilidade aos antibacilares

A realização dos testes de suscetibilidade aos antibacilares utilizados na terapêutica de infeções por *Mycobacterium* spp. é fundamental.

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é realizado no sistema BACTEC MGIT 960, baseando-se no crescimento de micobactérias num tubo que contem antibiótico e que é comparado com um tubo isento de antibiótico (controlo de crescimento), ou seja se o antibacilar testado no tubo inibir o crescimento não há consumo de oxigénio, logo não será detetada fluorescência.

Nas primeiras 24-48h após o MGIT positivar, pode-se realizar o antibiograma diretamente a partir do MGIT, no entanto após as 48h tem que proceder à diluição do MGIT uma vez que já houve um aumento exponencial da multiplicação bacteriana, o que pode levar ao falseamento dos resultados. O teste de suscetibilidade apenas pode ser realizado entre o primeiro e o quinto dia após o MGIT positivar.

Os antimicrobianos testados são os de primeira linha, nomeadamente a estreptomycin (S), isoniazida (I), rifampicina (R), etambutol (E) e pirazinamida (PZA). Para a realização do teste são utilizados tubos MGIT<sup>TM</sup> e dois kits, o BD BACTEC MGIT 960 SIRE e o BD BACTEC MGIT 960 PZA. Todos os tubos são enriquecidos com um suplemento de crescimento.

O MGIT<sup>TM</sup> utilizado para realizar os antibiogramas são incubados no BACTEC MGIT 960, que monitoriza o crescimento bacteriano e permite comparar o crescimento com o MGIT<sup>TM</sup> de controlo de crescimento que contem apenas a amostra e o suplemento de crescimento. Esta análise comparativa é realizada automaticamente pelo aparelho, para determinar o perfil de sensibilidade para cada um dos fármacos.

### **5.3 Virologia**

Os vírus são agentes etiológicos de diversas doenças humanas, podendo provocar doenças agudas ou crónicas, variando no seu espectro de severidade entre indolentes a letais (Carter e Saunders, 2007).

No laboratório de virologia são utilizadas técnicas de biologia molecular e imunoensaios, para o diagnóstico de infeções virais. As técnicas de biologia molecular são baseadas na extração, amplificação e deteção dos ácidos nucleicos virais, enquanto que os imunoensaios são baseados na deteção de complexos antigénio-anticorpo. A utilização destas técnicas permite a pesquisa e identificação do genoma viral, avaliação da resposta imunitária do hospedeiro e pesquisa de antígenos/ anticorpos no contexto de infeções virais.

A pesquisa e identificação do genoma viral é realizada pela técnica de PCR em tempo real, que oferece uma grande sensibilidade e reprodutibilidade. Através desta metodologia os



agentes etiológicos virais identificados são: Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), Vírus Herpes simplex, Vírus Varicela-Zóster, Citomegalovírus, Vírus Epstein-Barr, Vírus da Hepatite A, B, C e Poliomavírus.

As cargas virais (número de cópias do vírus/ mililitro de sangue) são determinadas para o VIH, Vírus da Hepatite B e Vírus da Hepatite C, permitindo a monitorização da evolução da infeção, assim como, da resposta terapêutica (Watzinger *et al.*, 2004).

No caso do VIH realizam-se testes de deteção de resistências à terapêutica antirretroviral sempre que suspeite de ineficácia terapêutica, antes de iniciar terapêutica antirretroviral para caracterização do vírus e periodicamente para monitorização pois, este é um vírus com elevada taxa de mutação. Para realizar este estudo de resistência aos fármacos antirretrovirais é necessário proceder à extração dos ácidos nucleicos virais, amplificação por PCR das regiões alvo da terapêutica e sequenciação dos produtos amplificados. Estes testes de deteção de resistências consistem na análise comparativa dos produtos de PCR amplificados, com uma base de dados que contem informação sobre as resistências conhecidas.

Os testes *multiplex* são realizados no FilmArray Torch, permitem a identificação de vários agentes etiológicos da infeção. Estes testes consistem na extração, amplificação por PCR e deteção automática dos alvos amplificados. Cada patógeno alvo tem pelo menos três ensaios replicados e múltiplos alvos para serem detetados, sendo que a interpretação final é determinada a partir do número de replicados que são positivos. As reações positivas são determinadas com base na análise da curva de *melting* do DNA dos produtos amplificados. Este equipamento tem vários painéis disponíveis: painel das infeções gastrointestinais, painel das infeções respiratórias e painel das meningites-encefalites. Cada painel testa vários microrganismos em simultâneo incluindo vírus, bactérias e parasitas que sejam passíveis de provocar essa infeção, permitindo um diagnóstico rápido (Babady, 2013).

No laboratório de virologia também se realiza a pesquisa de antigénios e/ou anticorpos no contexto de infeções virais, pela metodologia de quimioluminescência (Tabela 8).

**Tabela 8** - Anticorpos e/ou antígenos associados a infeções virais, pesquisados pela metodologia de quimioluminescência.

Agente etiológico viral	Anticorpos e/ou antígenos pesquisados
<b>Hepatite A</b>	Ig Total (IgM +IgG), se positivo realiza-se a pesquisa de IgM.
<b>Hepatite B</b>	Antígeno solúvel (AgHBe), Antígeno de superfície (AgHBs), Anticorpos anti-core total (anticorpo anti- HBc).
<b>Hepatite C</b>	Ig total
<b>Hepatite E</b>	Ig total
<b>HIV</b>	Anticorpos anti-HIV1, anticorpos anti-HV2, antígeno p24. Se positivo realiza-se o teste imunocromatográfico confirmatório (Geenius™ Bio-Rad). Se negativo realiza-se a pesquisa do antígeno p24 por quimioluminescência.

## 5.4 Parasitologia

As doenças parasitárias apresentam distribuição mundial, no entanto a prevalência destas doenças varia consoante a região geográfica, condições sanitárias e climáticas, apresentando maior incidência em países tropicais e subtropicais. As alterações climáticas e a globalização (aumento das viagens para regiões endémicas e comércio internacional) podem influenciar a dinâmica destas doenças (Tille, 2017).

No laboratório, uma das análises mais solicitadas neste sector é o exame parasitológico de fezes. A excreção de estruturas parasitárias (ovos, quistos ou trofozoítos) depende da fase do ciclo de vida em que se encontra o parasita, podendo a excreção ser intermitente. Por isso, deve-se realizar a colheita de fezes em três dias consecutivos, conservando as amostras a 4°C, até serem entregues no laboratório (Fernandes *et al.*, 2011). Para a realização deste exame é utilizado o método de Ritchie modificado. Este método permite a concentração dos parasitas fecais no sedimento, facilitando a recuperação dos ovos e dos quistos.

Para realizar o exame a fresco, coloca-se uma porção do sedimento obtido pela técnica de concentração, entre lâmina e lamela. Para a pesquisa de ovos utiliza-se a objetiva de 10x, enquanto que para a pesquisa de quisto se utiliza a objetiva de 40x. A observação de uma única estrutura parasitária estabelece o diagnóstico clínico.

Após a concentração pode-se realizar a coloração de Ziehl-Neelsen modificado (Anexo 3) para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp. e *Isospora belli*.

Em Portugal, estudos relativos à prevalência de parasitoses intestinais são raros. Os estudos no final da década de 80, início dos anos 90, indicam uma diminuição da prevalência

destas parasitoses, devido à melhoria das condições de higiene e sanitárias, e das medidas profiláticas de desparasitação de “rotina”. Com base nestes dados, estima-se que em Portugal a prevalência de parasitismo intestinal é baixa, sendo devida principalmente a *Giardia lamblia* e alguns helmintas, sendo um dos mais prevalentes o *Trichuris trichiura*. As crianças filhas de pais imigrantes apresentam uma taxa de parasitismo superior, com diferentes espécies de parasitas, colocando estas crianças num grupo potencialmente de risco (Fernandes et al., 2011).

A doença parasitária com maior impacto a nível mundial é a malária, com elevada prevalência nos países tropicais e subtropicais. Desde 1959 que em Portugal não são diagnosticados casos de malária autóctone, sendo apenas identificados casos importados de países tropicais onde a doença é endémica (Reis et al., 2018).

A pesquisa de *Plasmodium* spp. é uma situação de urgência, por isso pode-se realizar o teste imunocromatográfico para auxiliar o diagnóstico de malária, no entanto este teste não invalida a visualização das lâminas. Este teste imunocromatográfico deteta qualitativamente a Proteína Rica em Histidina-2 (HRP-2) de *Plasmodium falciparum* e uma aldolase, comum a quatro espécies de malária que podem infetar os humanos – *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. Os casos de parasitémia muito baixas podem levar a falsos negativos (Katakai et al., 2011).

No diagnóstico de malária realiza-se sempre a gota espessa e esfregaços de sangue periférico. No caso da malária, na gota espessa, há lise dos eritrócitos permitindo verificar a presença ou ausência do parasita, enquanto que os esfregaços permitem a identificação da espécie do parasita e determinar o grau de parasitémia. Se o *Plasmodium falciparum* ou o *Plasmodium knowlesi* forem observados é obrigatório determinar o grau de parasitémia, uma vez que permite avaliar a gravidade da doença.

Para a pesquisa de parasitas na corrente sanguínea como hemoflagelares (*Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp.), *Plasmodium* spp. e microfilárias procede-se à coloração de Giemsa dos esfregaços sanguíneos e/ou gota espessa, das amostras de sangue periférico.

## 5.5 Micologia

As infeções fúngicas aumentaram dramaticamente nos últimos anos, sobretudo devido a alterações no hospedeiro, como é o caso da imunossupressão, antibióterapias e procedimentos médicos invasivos. Assim, microrganismos que normalmente não são patogénicos ou que seriam parte da microbiota normal, começaram a provocar infeções originando um aumento das infeções fúngicas oportunistas. Por outro lado, os fungos

patogénicos primários parecem ter regiões geográficas bem conhecidas e por isso essas infeções são mais restritas a essas regiões (Tille, 2017).

Na micologia, tal como nas outras áreas da microbiologia, a qualidade da amostra depende de uma colheita bem executada, sendo um fator determinante para o isolamento e identificação do agente etiológico das infeções. As amostras devem ser devidamente processadas para poderem ser semeadas nos meios de cultura.

Para o isolamento de fungos, no laboratório é utilizado o meio SaCl. O período e a temperatura de incubação dependem do tipo de amostra, sendo 4 semanas a 25-27°C para amostras superficiais e pelo menos uma semana a 30-35°C para as restantes amostras (Tille, 2017).

Um conjunto de critérios permite orientar na identificação tais como, o tempo de crescimento das colónias, aspeto e coloração. Assim, a identificação fúngica é feita através da observação macroscópica e microscópica das colónias.

A observação microscópica das colónias é indispensável, e para tal retira-se uma porção da periferia da cultura e coloca-se entre lâmina e lamela com ou sem azul de lactofenol. A coloração com azul de lactofenol, no caso dos fungos filamentosos permite a observação das hifas (septadas ou cenocíticas), morfologia e disposição dos esporos, e qual o tipo de conidiogénese (Tille, 2017).

O isolamento de um fungo no meio de cultura não significa necessariamente que este seja o agente patogénico responsável pela infeção, por isso deve-se ter sempre em conta os sintomas do paciente, o tipo de amostra e o tempo de crescimento do fungo identificado, pois permite uma orientação na pesquisa de um determinado grupo de fungos.

## **5.6 Serologia**

A serologia é uma ferramenta extremamente útil no diagnóstico de doenças infecciosas. Esta área estabelece uma relação entre a microbiologia e a imunologia, uma vez que na presença de agentes patogénicos o sistema imunitário de um hospedeiro imunocompetente reage, permitindo determinar e quantificar a presença de antígenos e anticorpos.

Durante uma infeção é desenvolvida uma resposta humoral, ou seja, há produção de anticorpos. A presença de Imunoglobulinas M (IgM) indicam uma infeção corrente ou recente, pois estas imunoglobulinas surgem após uma primeira exposição a um patógeno, enquanto que a presença de Imunoglobulinas G (IgG) indicam uma infeção passada ou imunidade adquirida.

Nos recém-nascidos a presença de IgM indica uma infecção congénita visto que estas imunoglobulinas não atravessam a placenta. Nos primeiros meses de vida os recém-nascidos ainda possuem títulos de IgG maternos. Em caso de suspeita de infecção congénita, os recém-nascidos são monitorizados ao longo do tempo devido à dificuldade de determinar a presença de infecção congénita. As IgGs detetadas podem ser de origem materna, por isso para se poder interpretar o valor da IgG é necessário estudar duas amostras em paralelo: uma amostra após o nascimento e outra aproximadamente seis semanas depois, devido à vida-média das IgG (25-30 dias). O aumento do título de IgG indica infecção congénita, contudo o recém-nascido deve ser monitorizado ao longo do tempo para avaliar a cinética dos anticorpos (Stevens, 2009).

Deste modo, a serologia permite determinar se existiu exposição a um determinado agente infeccioso, identificar o tipo de anticorpos presentes nas amostras, avaliar o estado de imunidade do hospedeiro e avaliar a cinética dos anticorpos. A cinética dos anticorpos permite distinguir várias situações: infecção aguda, crónica, re-infecção ou seroconversão (Stevens, 2009).

A alteração no título de anticorpos permite fazer o diagnóstico e monitorização da progressão da doença, sendo que o título de anticorpos é a maior diluição de soro na qual ainda são detetáveis anticorpos (Tille, 2017).

As metodologias utilizadas consistem na deteção do complexo antigénio-anticorpo através de imunofluorescência, testes imunoenzimáticos, testes de aglutinação ou quimioluminescência.

As amostras que chegam a este sector são sobretudo de grávidas uma vez que, durante a gravidez é obrigatório o estudo para infeções do grupo STORCH (Sífilis, *Toxoplasma* spp., Vírus da Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simplex) que podem provocar anomalias congénitas e complicações pós-natais graves (Tille, 2017).

No caso de amostras para o diagnóstico de infeções por agentes microbiológicos, uma amostra não permite um diagnóstico conclusivo, por isso deve ser enviada uma nova amostra ao fim de 2-3 semanas (fase de convalescência) para comparar a cinética de anticorpos.

## **6. Bioquímica Clínica**

A área da Bioquímica Clínica é uma área multidisciplinar por isso, várias são as especialidades médicas que a requisitam para o diagnóstico e monitorização de patologias,

sendo por isso o sector que apresenta maior fluxo de amostras diariamente. Esta área encontra-se sobretudo centralizada no *Corelab* do CHUC sendo a mais automatizada do laboratório.

Durante o mês que estive no laboratório de Bioquímica Clínica apenas acompanhei o processo de validação dos resultados, devido à implementação e adaptação da nova cadeia de equipamentos no *Corelab*. No presente relatório apenas abordo esta área de forma sucinta, de acordo com as normas estabelecidas para a elaboração do mesmo.

A maioria das determinações dos diferentes parâmetros bioquímicos são efetuadas nos equipamentos *Alinity c* (Abbott), através de ensaios potenciométricos e fotométricos.

Os principais parâmetros realizados, avaliam as funções dos respetivos órgãos e sistemas do corpo Humano, nomeadamente a função renal, função pancreática, função hepática, função cardíaca, metabolismo glucídico, metabolismo ósseo, metabolismo proteico e metabolismo lipídico (Tabela 9).

As amostras de urina de 24h ou amostras de urina ocasionais são tratadas numa sala exterior ao *Corelab*. A análise do sedimento urinário é realizada no equipamento *SediMAX AX-4010* (A.Menarini diagnostics) que possui um microscópio incorporado e regista vários campos, enquanto que a análise química é realizada no *AutionMAX AX-4280* (Beckman Coulter). O sedimento urinário permite-nos observar os elementos figurados presentes na urina como eritrócitos, leucócitos, cristais, cilindros, bactérias, células epiteliais e muco. A análise sumária da urina permite-nos obter resultados acerca da densidade, pH, eritrócitos, leucócitos, corpos cetónicos, nitritos, bilirrubina, urobilinogénio, proteínas e glicose.

**Tabela 9** – Principais parâmetros bioquímicos determinados para avaliação das diferentes funções fisiológicas.

<b>Função/Metabolismo</b>	<b>Parâmetro bioquímico</b>
Função Renal	Creatinina, Ureia, Ácido úrico, Microalbuminúria
Função Pancreática	Lipase, $\alpha$ -Amilase
Função Hepática	AST, ALT, ALP, $\gamma$ -GT, Bilirrubina Total, Bilirrubina Directa
Função Cardíaca	Troponina I, CK, BNP, LDH
Metabolismo Glucídico	Glucose, HbA1C
Metabolismo Ósseo	Magnésio, Fosfato, Cálcio
Metabolismo Proteico	Proteínas Séricas Totais, Albumina
Metabolismo do Ferro	Ferro, Transferrina
Metabolismo Lipídico	Colesterol Total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Triglicerídeos

## 7. Hematologia

A área da Hematologia é responsável pelo estudo do sistema hematopoético, incluindo os órgãos e tecidos responsáveis pela proliferação, maturação e destruição das células sanguíneas, e ainda, pelo estudo da hemostase.

Durante o período de estágio no laboratório de Hematologia (7 semanas) participei na receção e processamento das amostras, realizei manutenções diárias e acompanhei a validação dos resultados, permitindo-me compreender toda a dinâmica laboratorial subjacente. Tal como na Bioquímica Clínica, esta área também é referida de um modo geral tendo em conta as normas estabelecidas para a elaboração do relatório.

Os testes efetuados com maior frequência neste sector são o hemograma, velocidade de sedimentação e as provas de coagulação que avaliam a hemostase.

Para realização do hemograma completo (eritrograma, leucograma e plaquetograma) e velocidade de sedimentação, a amostra utilizada é o sangue total colhido para tubos com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) como anticoagulante. A velocidade de sedimentação é realizada no equipamento *Alifax Test / BCL* enquanto que os hemogramas são realizados no equipamento *Sysmex XN-3100*.

Os esfregaços de sangue periférico são corados pela técnica de May-Grünwald Giemsa e apenas são realizados quando os hemogramas apresentam alterações, quando solicitados pelo médico ou caso se justifique no contexto da informação clínica.

Para o estudo da hemostase o sangue é colhido para tubos que contêm citrato de sódio como anticoagulante e centrifugados durante 15 minutos, a 3000 r.p.m, para obtenção do plasma sanguíneo. É muito importante respeitar a proporção anticoagulante/ sangue (1 volume de citrato de sódio/ 9 volumes de sangue), pois pode influenciar os resultados dos tempos de coagulação. Os testes de rotina realizados mais frequentemente para avaliação da hemostase são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10**– Testes para avaliação da hemostase realizados mais frequentemente, respetiva metodologia e equipamento utilizado.

Testes	Metodologias	Equipamento
Tempo de Protrombina (PT)	Turbidimetria	ACL TOP 750 Werfen
Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (aPTT)		
Quantificação de Fibrinogénio (QFA)		
D-dímeros	Imunoturbidimetria	

## 8. Interpretação laboratorial de um caso clínico

De forma a exemplificar a integração do conhecimento adquirido ao longo do Mestrado em Análises Clínicas, bem como durante o período de estágio apresento a interpretação laboratorial de um caso clínico que acompanhei no Serviço de Patologia Clínica do CHUC, onde é possível observar a correlação das diferentes áreas laboratoriais.

Uma criança com 12 meses, do sexo feminino, foi à urgência do Hospital Pediátrico. A criança apresentava febre com mais de 10 dias de evolução e hepatoesplenomegalia palpável. Criança previamente saudável, no entanto, com várias intercorrências víricas nos últimos 6 meses relacionadas com a frequência da creche. Não apresentava antecedentes familiares relevantes conhecidos.

Foi pedido um hemograma que revelou anemia microcítica hipocrômica, leucocitose e ligeira reticulocitose (Tabela II). Para além disso apresentava uma velocidade de sedimentação aumentada (Tabela II). Realizou-se um esfregaço de sangue periférico que confirmou a fórmula diferencial leucocitária sendo que cerca de 30% dos linfócitos apresentavam: dimensões aumentadas, com citoplasma abundante, basófilo e cromatina mais laxa, sugestivos de ativação linfocitária.

○ *screening* dos testes para avaliação da hemostase estava normal.

Os parâmetros bioquímicos realizados revelaram ligeiro aumento da Proteína C Reactiva 4.4 mg/dL (normal: <1,0) e elevação das enzimas: Gama-Glutamiltransferase 205 UI/L (normal: 12-58), Transaminase Oxalacética 92 UI/L (normal: 5-60), Transaminase G. Pirúvica 67 UI/L (normal: 5-45), Desidrogenase Láctica 915 UI/L (normal: 500-920), sugestivo de lesão hepatocelular.



**Tabela 11**– Parâmetros realizados no sector de hematologia, resultados obtidos e respetivos valores de referência.

Parâmetro	Resultados			Valores de Referência	
	Dia 1	Dia 8	Dia 15		
<b>Hemograma</b>					
Eritrócitos	<b>3,45</b>	4,02	4,67	x10 <sup>6</sup> uL	4,0-5,2
Hemoglobina	<b>8,9</b>	<b>9,9</b>	<b>10,9</b>	g/dL	11,1-14,1
Hematócrito	<b>25,2</b>	<b>30,0</b>	35,3	%	34-40
Volume Globular Médio	<b>73,1</b>	<b>74,8</b>	75,7	fL	75-87
Hemoglobina Globular Média	25,7	<b>24,6</b>	<b>23,3</b>	pg	25-33
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	35,2	32,8	<b>30,8</b>	g/dL	31-37
RDW	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	%	11,6-14
Reticulócitos	<b>2,43</b>	-	<b>6</b>	%	1-2
Leucócitos	<b>30,70</b>	<b>47,00</b>	<b>21,70</b>	x10 <sup>3</sup> uL	5-15
Neutrófilos	23,7% (7,28)	11,7% (5,50)	12,3% (2,67)		1,5-8,0
Linfócitos	<b>63,3%</b> (19,43)	<b>76,6%</b> (36,02)	<b>78,7%</b> (17,09)		6-9
Monócitos	<b>11,90%</b> (3,65)	<b>10,70%</b> (5,03)	<b>8,02%</b> (1,74)		0,2-1,0
Eosinófilos	<b>0,71%</b> (0,22)	<b>0,19%</b> (0,09)	<b>0,45%</b> (0,10)		0,1-1,0
Basófilos	<b>0,405%</b> (0,12)	<b>0,777%</b> (0,37)	0,491% (0,11)		0,0-0,2
Plaquetas	428	296	396	x10 <sup>3</sup> uL	200-450
<b>Velocidade de Sedimentação</b>	<b>82</b>	-	<b>34</b>	mm /1 <sup>h</sup>	<13

Tendo em conta os resultados obtidos e a sintomatologia apresentada, o diagnóstico mais provável seria Mononucleose infecciosa. A Mononucleose infecciosa pode ser devido ao Vírus Epstein-Barr ou Citomegalovírus. Por isso, realizou-se a pesquisa de anticorpos anti-Epstein-Barr e anti-Citomegalovírus e ainda, as respetivas cargas virais.

As análises serológicas efetuadas no dia em que a criança recorreu ao serviço de urgência, demonstram evidência serológica compatível com infeção recente por Citomegalovírus e serologia compatível com infeção recente ou passada por Epstein-Barr, devido à ausência de anticorpos anti-EBNA IgG (Tabela 12). No entanto, após realização das cargas virais, não foi detetado o DNA viral de Epstein-Barr, sendo detetado apenas o DNA

viral de Citomegalovírus (12905 cópias/mL) (Tabela 13). Assim, a detecção do DNA viral de Citomegalovírus permitiu o diagnóstico definitivo de infecção por Citomegalovírus.

**Tabela 12**– Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos para Citomegalovírus e Epstein-Barr. Através dos resultados obtidos na pesquisa de anticorpos para Citomegalovírus é possível observar o decurso da infecção.

Pesquisa de Anticorpos	Resultados			
	Dia 1	Dia 15	Após 2 meses	
<b>Anticorpos para Citomegalovírus IgG</b> Negativo < 6 UA/mL Positivo ≥ 6 UA/mL	Índice 2,8 <b>Negativo</b>	Índice 37,4 <b>Positivo</b>	Índice > 250,0 <b>Positivo</b>	UA/mL
<b>Anticorpos para Citomegalovírus IgM</b> Negativo < 0,85 UA/mL Equívoco ≥ 0,85- <1,0 UA/mL Positivo ≥ 1,0 UA/mL	Índice 1,40 <b>Positivo</b>	Índice 29,24 <b>Positivo</b>	Índice 3,37 <b>Positivo</b>	UA/mL
<b>Anticorpos para Epstein-Barr -VCA IgG</b> Negativo < 0,75 UA/mL Equívoco ≥ 0,75- <1,0 UA/mL Positivo ≥ 1,0 UA/mL	Índice 5,6 <b>Positivo</b>	-	-	UA/mL
<b>Anticorpos para Epstein-Barr -VCA IgM</b> Negativo < 0,75 UA/mL Equívoco ≥ 0,5- <1,0 UA/mL Positivo ≥ 1,0 UA/mL	Índice 0,5 <b>Negativo</b>	-	-	UA/mL
<b>Anticorpos para Epstein-Barr -EBNA IgM</b> Negativo < 0,5 UA/mL Equívoco ≥ 0,5- <1,0 UA/mL Positivo ≥ 1,0 UA/mL	Índice 0,0 <b>Negativo</b>	-	-	UA/mL

**Tabela 13**– Resultados obtidos na determinação das Cargas virais de Citomegalovírus e Epstein-Barr. A carga viral de Citomegalovírus foi monitorizada durante 2 meses, até deixar de ser detetada.

Carga Viral	Resultados			
	Dia 1	Dia 8	Dia 15	Após 2 meses
<b>Citomegalovírus</b>	Detectado 12905 cópias/mL	Detectado 13995 cópias/mL	Detectado 344 cópias/mL	Não detectado
<b>Epstein-Barr</b>	Não detectado	-	-	-

Ao longo de 2 meses a criança foi monitorizada na Consulta de Doenças Infeciosas, realizando a determinação da carga viral de Citomegalovírus, pesquisa de anticorpos para Citomegalovírus, hemogramas e parâmetros bioquímicos.

A anemia apresentada pela criança devido à infecção aguda por Citomegalovírus, normalizou à medida que a infecção passou.

Os parâmetros bioquímicos inicialmente alterados, normalizaram ao fim dos 2 meses: Proteína C Reativa 0,07 mg/dL (normal: <1,0), Gama-Glutamiltransferase 10 UI/L (normal: 12-58), Transaminase Oxalacética 52 UI/L (normal: 5-60), Transaminase G. Pirúvica 27 UI/L (normal: 5-45), Desidrogenase Láctica 415 UI/L (normal: 500-920).

Através da pesquisa de anticorpos para Citomegalovírus, foi possível fazer o acompanhamento serológico (cinética dos anticorpos) durante a infecção (Tabela 12), verificando-se uma diminuição da IgM e aumento da IgG, assim como uma diminuição gradual da carga viral de Citomegalovírus (Tabela 13).

#### ▪ Infecção por Citomegalovírus

O Citomegalovírus pertence à família *Herpesviridae* e sub-família *Betaherpesvirus*. Apresenta o genoma de DNA em cadeia dupla que codifica mais de 35 proteínas estruturais e glicoproteínas. Este vírus apresenta distribuição mundial, sendo o Homem o seu único reservatório (Vide Tavares *et al.*, 2011).

Tal como outros membros da família *Herpesviridae*, este vírus fica latente no hospedeiro após uma primo-infecção. Durante a fase de latência podem ocorrer infecções secundárias, porque a imunidade adquirida não confere proteção completa (Vide Tavares *et al.*, 2011).

A transmissão é inter-humana ou por via hematogena (transfusões ou transplantação). As principais células infetadas são os leucócitos e as células endoteliais, sendo a propagação feita por via hematogena. Durante a fase de virémia é possível fazer o diagnóstico laboratorial (Vide Tavares *et al.*, 2011).

A manifestação mais frequente da primo-infecção por Citomegalovírus é a Mononucleose Infeciosa, sendo caracterizada por febre prolongada, fadiga, mialgias, cefaleias e esplenomegalia.

No diagnóstico laboratorial há presença de leucocitose, com um predomínio superior a 50% de linfócitos, dos quais mais de 10% são atípicos. Para além disso, há alteração da função hepática uma vez que este vírus tem tropismo para os hepatócitos (Willey, Sherwood e Woolverton, 2007).



## 9. Conclusão

A realização do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas integra a realidade laboratorial com os conceitos teóricos obtidos anteriormente. Para além disso, conferiu-me a aquisição de novos conhecimentos teóricos e práticos, e interpretação de resultados analíticos obtidos em contextos clínicos reais, para além da compreensão de toda a dinâmica laboratorial.

No laboratório do CHUC, foi possível observar a aplicação de tecnologias emergentes no âmbito das Análises Clínicas, com um natural ênfase nos processos de automatização, devido à sua superior fiabilidade, reprodutibilidade e robustez. No entanto, não deixa de ser necessário o conhecimento dos fundamentos teóricos subjacentes a estes processos automáticos, uma vez, que são necessários para minimizar e corrigir os erros associados às diferentes fases analíticas: pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Tive a oportunidade de acompanhar experimentalmente as áreas de Imunologia, Microbiologia, Bioquímica Clínica e Hematologia, que referi no presente relatório, embora só desenvolvi teoricamente neste documento, de acordo com as normas de elaboração do relatório do Mestrado em Análises Clínicas, duas áreas: Microbiologia e Imunologia, pelo interesse e curiosidade que suscitaram em mim ao longo do estágio.

O período de estágio contribuiu inequivocamente para compreender o quão importante é necessário colaborar com as diversas áreas clínicas com o objetivo final de permitir ao prestador de cuidados de saúde uma tomada de decisão baseada em resultados exatos e precisos, e também compreender que é necessário uma permanente atualização e estudo uma vez que, a área das Análises Clínicas estão em constante evolução.



## 10. Bibliografia

ASPEVALL, O. *et al.* - Performance of Four Chromogenic Urine Culture Media after One or Two Days of Incubation Compared with Reference Media. **Journal of Clinical Microbiology**. 40:4 (2002) 1500–1503.

BABADY, N. - The FilmArray® respiratory panel: an automated, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. 13:8 (2013) 779–788.

BARBER, S.; LAWSON, P.; GROVE, D. - Evaluation of bacteriological transport swabs. **Pathology**. 30:2 (1998) 179–182.

BOURBEAU, P. *et al.* - Use of the BacT/Alert blood culture system for culture of sterile body fluids other than blood. **Journal of Clinical Microbiology**. 36:11 (1998) 3273–3277.

BRYAN, L.; KOWAND, S.; ELZEN, H. VAN DEN - Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 15:1 (1979) 7–13.

BUCHAN, B. *et al.* - Multicenter Clinical Evaluation of the Xpert GBS LB Assay for Detection of Group B Streptococcus in Prenatal Screening Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 53:2 (2015) 443–448.

BURTIS, C.; BRUNS, D. - **Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular**. 7ª ed. [S.l.] : Elsevier, 2016

BYEON, H. *et al.* - Performance of the SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test for quick confirmation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals. **Journal of Veterinary Science**. 16:1 (2015) 31.

CARTER, J.; SAUNDERS, V. - **Virology: Principles and applications**. 1st. ed. [S.l.] : Wiley, 2007

CHAN, E. *et al.* - Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014–2015. **Frontiers in Immunology**. 6:2015) 1–13.

CSAKO, G. - Protein Electrophoresis. Em **Methods in Molecular Biology**. [S.l.] : Humana Press, 2012v. 869. p. 147–171.

D'INZEO, T. *et al.* - Comparison of *Mycoplasma* IES, Mycofast Revolution and

Mycoplasma IST2 to detect genital mycoplasmas in clinical samples. **The Journal of Infection in Developing Countries**. 11:01 (2017) 98.

DORMAN, S. *et al.* - Genotype MTBDRplus for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis and Drug Resistance in Strains from Gold Miners in South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**. 50:4 (2012) 1189–1194.

ERKOSE, G. *et al.* - Evaluation of FluoroType MTB for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex and GenoType MTBDRplus for determining rifampicin and isoniazid resistance. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. 32:4 (2018) 999–1004.

FERNANDES, S. *et al.* - Protocolo de parasitoses intestinais. **Acta Pediátrica Portuguesa**. 11:2011) 35–41.

FONSECA, A. *et al.* - **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. [S.l.] : Infecção, Instituto Nacional de Saúde Dr.Ricardo Jorge: Programa Nacional de Controlo de, 2004

GERLACH, S. *et al.* - Automated Evaluation of Crithidia luciliae Based Indirect Immunofluorescence Tests: A Novel Application of the EUROPattern-Suite Technology. **Journal of Immunology Research**. 2015:2015) 1–8.

GIBBONS, R.; MACDONALD, J. - Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of Bacteroides melaninogenicus. **Journal of bacteriology**. 80:1960) 164–170.

GITTI, Z. *et al.* - Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays To Analyze 76 Nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece. **Journal of Clinical Microbiology**. 44:6 (2006) 2244–2246.

GOLDENBERG, S. *et al.* - Performance of the GeneXpert CT/NG Assay Compared to That of the Aptima AC2 Assay for Detection of Rectal Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by Use of Residual Aptima Samples. **Journal of Clinical Microbiology**. 50:12 (2012) 3867–3869.

GRANGE, R.; THOMPSON, J.; LAMBERT, D. - Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. **British Journal of Anaesthesia**. 112:2 (2014) 213–216.

HAGE, M.; HAMSTEN, C.; VALENTA, R. - ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 140:4 (2017) 974–977.



HALL, K.; LYMAN, J. - Updated review of blood culture contamination. **Clinical Microbiology Reviews**. 19:4 (2006) 788–802.

JOHANSSON, S. - ImmunoCAP® Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. 4:3 (2004) 273–279.

JORGENSEN, J.; FERRARO, M. - Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**. 49:11 (2009) 1749–1755.

KASSAZA, K. *et al.* - Lowenstein-Jensen Selective Medium for Reducing Contamination in Mycobacterium tuberculosis Culture. **Journal of Clinical Microbiology**. 52:7 (2014) 2671–2673.

KATAKAI, Y. *et al.* - Evaluation of the NOW Malaria Immunochromatographic Test for Quantitative Diagnosis of Falciparum and Vivax Malaria Parasite Density. **Tropical Medicine and Health**. 39:4 (2011) 105–108.

KEREN, D. - **Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis**. [S.l.] : Hodder Arnold, 2003

LEE, A. *et al.* - Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures Are Needed? **Journal of Clinical Microbiology**. 45:11 (2007) 3546–3548.

LEE, A. *et al.* - Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays. **British Journal of Hospital Medicine**. 78:2 (2017) C18–C20.

LEE, D. *et al.* - Clinical Evaluation of BacT/Alert FA Plus and FN Plus Bottles Compared with Standard Bottles. **Journal of Clinical Microbiology**. 51:12 (2013) 4150–4155.

LEE, W. *et al.* - Evaluation of VITEK Mass Spectrometry (MS), a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight MS System for Identification of Anaerobic Bacteria. **Annals of Laboratory Medicine**. 35:1 (2015) 69.

LEWIS, F.; BERNSTEIN, K.; ARAL, S. - Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. **Obstetrics & Gynecology**. 129:4 (2017) 643–654.

LÓPEZ-CERERO, L.; ETXEBARRIA, J.; MENSA, J. - Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. 27:9 (2009) 531–535.

LUM, K.; MEERS, P. - Boric acid converts urine into an effective bacteriostatic transport medium. **The Journal of infection**. 18:1 (1989) 51–58.

LUMBRERAS, B. *et al.* - Analysis for crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 64:4 (2005) 612–615.

MA, B.; FORNEY, L.; RAVEL, J. - Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. **Annual Review of Microbiology**. 66:1 (2012) 371–389.

MADIGAN, M. *et al.* - Diagnostic Microbiology and Immunology. Em **Brock Biology of microorganisms**. 13th. ed. p. 1155.

MAHLER, M. *et al.* - Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. 38:1 (2016) 14–20.

MATUSCHEK, E. *et al.* - Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* , *Pseudomonas aeruginosa* , and *Acinetobacter* spp. **Clinical Microbiology and Infection**. 24:8 (2018) 865–870.

MORRISON, T. *et al.* - Laboratory assessment of multiple myeloma. Em **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2019v. 89. p. 1–58.

MUÑOZ, P. *et al.* - The CLED agar option in urine culture routine. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 15:4 (1992) 287–290.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. - Laboratory Diagnosis of Bacterial Diseases. Em **Medical Microbiology**. 8th. ed. [S.l.] : Elsevier, 2016. p. 932.

OWEN, J.; PUNT, J.; STRANFORD, S. - **Kuby Immunology**. 7th. ed. [S.l.] : W. H. Freeman, 2013

PELEG, A.; HOOPER, D. - Hospital-acquired infections due Gram-negative bacteria. **The New England Journal of Medicine**. 362:19 (2010) 1804–1813.

REIS, T. *et al.* - Malária : confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infecção por *Plasmodium* sp . entre 2010-2017. **Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge: Boletim Epidemiológico**. 2018) 52–57.

RICHTER, E. *et al.* - Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical. **Society**. 41:6 (2003) 2672–2675.

RUSAK, E. *et al.* - Anti-parietal cell antibodies – diagnostic significance. **Advances in Medical Sciences**. 61:2 (2016) 175–179.

SEBODE, M. *et al.* - Autoantibodies in Autoimmune Liver Disease—Clinical and Diagnostic Relevance. **Frontiers in Immunology**. 9:2018) 1–12.

SHIN, S. *et al.* - Evaluation of the Xpert Clostridium difficile Assay for the Diagnosis of Clostridium difficile Infection. **Annals of Laboratory Medicine**. 32:5 (2012) 355.

STEVENS, C. - **Clinical Immunology and Serology: a laboratory perspective**. 3rd. ed. [S.I.] : F.A. Davis Company, 2009

SUWANCHOTE, S. *et al.* - Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and their clinical significance. **Clinical Rheumatology**. 37:4 (2018) 875–884.

TILLE, P. - **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 14th. ed. [S.I.] : Elsevier, 2017

TORTOLI, E. *et al.* - Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: Multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**. 37:11 (1999) 3578–3582.

VIDE TAVARES, M. *et al.* - Citomegalovírus: Existe lugar para o rastreio durante a gravidez? **Acta Medica Portuguesa**. . ISSN 16460758. 24:2011) 1003–1008.

WATZINGER, F. *et al.* - Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. **Journal of Clinical Microbiology**. 42:11 (2004) 5189–5198.

WIESER, A. *et al.* - MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**. 93:3 (2012) 965–974.

WILLEY, J.; SHERWOOD, L.; WOOLVERTON, C. - **Prescott, Harley, and Klein's Microbiology**. 7th. ed. [S.I.] : McGraw-Hill Science Engineering, 2007



## Anexos

### Anexo 1

Coloração de Gram (Tille, 2017)

	Etapas	Tempo
<b>Corante 1</b>	Cristal de violeta	30 segundos
<b>Mordente</b>	Soluto de lugol	30 segundos
<b>Diferenciador</b>	Álcool-acetona Lavagem com água	Até descorar
<b>Corante 2</b>	Fucsina ácida	10 segundos

### Anexo 2

Coloração de Kinyoun (Tille, 2017)

	Etapas	Tempo
<b>Corante 1</b>	Carbol-fucsina Lavagem com água	5 minutos
<b>Diferenciador</b>	Álcool-Ácido Lavagem com água	1 minuto
<b>Corante 2</b>	Azul de metileno	1 minuto

### Anexo 3

Coloração Ziehl-Neelsen modificado (Tille, 2017)

	Etapas	Tempo
<b>Fixador</b>	Metanol	1 minuto
<b>Corante 1</b>	Fucsina	10 minutos
<b>Diferenciador</b>	Lavagem com água Ácido clorídrico 1% e álcool Lavagem com água	Até descorar
<b>Corante 2</b>	Verde malaquite Lavagem com água	30 segundos