



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Sofia Freire Leal Saldanha

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Joana Barbosa de Melo e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2023

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Sofia Freire Leal Saldanha

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas realizado no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra orientado pela Professora Doutora Joana Barbosa de Melo e realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2023

Agradecimentos

Aos meus pais, por me darem sempre a oportunidade de seguir os meus sonhos e por estarem sempre lá para me apoiar.

Ao meu irmão e à Marina, por me ajudarem sempre em tudo o que preciso e por me mostrarem que somos nós que definimos o nosso próprio destino.

Aos meus avós, por todos os ensinamentos que me têm transmitido, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo e amizade.

Ao Pedro, por todo o apoio e carinho, por acreditar em mim e nunca me deixar desistir.

À Carmen, por estar sempre lá, por todos os conselhos e por fazer de Coimbra, casa.

Ao Nery, por se ter tornado família, e por manter os Poetas da Noite sempre vivos.

À Mó, por ser a melhor colega de casa que se pode pedir.

À Beta e à Cabrera, que tornaram as noites de Coimbra em experiências inesperadas.

Aos meus afilhados, que apesar da distância, tudo se mantém igual.

À Ana, pela amizade de uma vida.

A todos os meus amigos, de infância e de Faculdade, pelas grandes noites e jantaradas.

Aos meus gatos, pelos mimos e turras.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por estes anos maravilhosos.

À Professora Doutora Ana Miguel Matos, por todo o cuidado, atenção e carinho que
teve comigo ao longo destes meses.

A toda a equipa do LACUC, por me terem acolhido tão bem e me terem dado
ferramentas essenciais para o meu futuro.

A toda a equipa do LCG-FMUC, pela experiência que me proporcionaram, foi muito
enriquecedora.

A Coimbra, a minha segunda casa, a todas as vivências e a todos os amigos que levo
comigo para a vida.

O meu mais puro obrigada!

“Everything will be okay in the end.

If it’s not okay, it’s not the end.”

John Lennon

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE CITOGENÉTICA.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. CITOGENÉTICA.....	16
3. AMOSTRAS.....	17
4. PROCEDIMENTO DE CULTURA CELULAR PARA REALIZAR UM DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO.....	18
4.1 <i>Culturas Celulares</i>	18
4.1.1 Manutenção das culturas celulares.....	18
4.2 <i>Manipulação Celular</i>	19
4.3 <i>Bandagem</i>	22
4.3.1 Bandagem GTL (Bandas G, usando Tripsina e corante Giemsa/Leishman).....	23
4.4 <i>Análise microscópica</i>	23
5. CARIÓTIPOS.....	24
6. SISTEMA INTERNACIONAL DE NOMENCLATURA CITOGENÉTICA HUMANA (ISCN).....	25
7. RELATÓRIOS LABORATORIAIS.....	25
7.1 <i>Tempo até obter o relatório</i>	25
8. COMPONENTE PRÁTICA.....	25
9. CONCLUSÃO.....	26
10. CASOS CLÍNICOS.....	27
RELATÓRIO DE ESTÁGIO NO LACUC.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. CARACTERIZAÇÃO DO LACUC.....	30
3. AMOSTRAS.....	31
4. CONTROLO DE QUALIDADE.....	31
5. IMUNOLOGIA.....	32
5.1 <i>Architect i1000</i>	32
5.1.1 Marcadores Tumorais.....	34
5.1.2 Hormonas da tiroide.....	34
5.1.3 Autoanticorpos da tiroide.....	35
5.1.3.1 Caso Clínico.....	36
5.1.4 Hormonas da reprodução.....	36
5.1.4.1 Caso Clínico.....	37
5.1.5 Vitaminas.....	38

5.1.6	Imunoglobulinas.....	38
5.1.7	Proteínas.....	39
5.2	VIDAS.....	39
5.2.1	Caso Clínico	42
5.3	Técnicas Manuais.....	43
5.3.1	RPR.....	43
5.3.1.1	Caso Clínico.....	43
5.3.2	Tipagem sanguínea.....	44
5.3.3	Teste de Coombs Indireto.....	45
5.3.4	Teste de gravidez.....	45
5.3.5	Pesquisa de sangue oculto nas fezes.....	46
5.3.6	Teste Rápido de COVID-19	46
6.	MICROBIOLOGIA.....	47
7.	HEMATOLOGIA	48
8.	BIOQUÍMICA.....	49
9.	OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	50
10.	CONCLUSÃO.....	52
	BIBLIOGRAFIA	53

Lista de Figuras

FIGURA 1 - AMOSTRA DE VILOSIDADE CORIÓNICAS	17
FIGURA 2 - OBSERVAÇÃO DA CONFLUÊNCIA DAS CÉLULAS.....	19
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE MANIPULAÇÃO CELULAR.....	20
FIGURA 4 - EXEMPLO DE CÂMARA DE ESPALHAMENTO E TEMPERATURA CONTROLADAS (THERMOTRON).....	21
FIGURA 5 - ESPALHAMENTO EM LÂMINA MOLHADA.....	22
FIGURA 6 - OBSERVAÇÃO DA QUALIDADE DO ESPALHAMENTO	22
FIGURA 7 - CROMOSSOMAS CORADOS COM BANDAGEM GTL.....	23
FIGURA 8 - IMAGEM DOS CROMOSSOMAS OBSERVADOS AO MICROSCÓPIO	24
FIGURA 9 - CARIÓTIPO CASO CLÍNICO 1.....	27
FIGURA 10 - CARIÓTIPO CASO CLÍNICO 2.....	29
FIGURA 11 - TIPAGEM SANGUÍNEA.....	44
FIGURA 12 - TESTE DE GRAVIDEZ.....	46
FIGURA 13 - TESTE RÁPIDO DE COVID-19.....	47
FIGURA 14 - IMAGEM DO POSTER RETIRADA DO LIVRO DE RESUMOS DO CONGRESSO	51

Lista de Tabelas

TABELA 1 - ENDOCRINOLOGIA DO CASO CLÍNICO 1	36
TABELA 2 - ENDOCRINOLOGIA DO CASO CLÍNICO 2.....	38
TABELA 3 - ANÁLISES DO CASO CLÍNICO	42
TABELA 4 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	50

Lista de Abreviaturas

β HCG	Gonadotrofina Coriónica Humana Beta
Ac	Anticorpo
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
Ag	Antigénio
AgHBs	Antigénio de superfície do vírus da hepatite B
ALT	Alanina Aminotransferase
anti-HBc	Anticorpos contra o antigénio central do vírus da hepatite B
anti-HBs	Anticorpos contra uma proteína presente na superfície do vírus da hepatite B
Anti-HCG	Anticorpo da Gonadotrofina Coriónica Humana
anti-HCV	Anticorpos de imunoglobulina G contra o vírus da hepatite C
APTT	Tempo de tromboplastina parcial ativado
AST	Aspartato Aminotransferase
CK	Creatinina Cinase Total
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CRP	Proteína C Reativa
CVS	Biópsia das vilosidades coriónicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;
FA	Fosfatase Alcalina
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
FT3	Hormona Triiodotironina Livre
FT4	Hormona Tiroxina Livre
FTA-Abs	Teste de absorção de anticorpos treponémicos fluorescentes
GGT	Gama-Glutamil Transferase

HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana
LACUC	Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra
LCG-FMUC	Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
LDH	Lactato Desidrogenase
LH	Hormona Luteinizante
NIPT	Teste Pré-natal não invasivo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSA	Antigénio Específico da Próstata
PT	Tempo de protrombina
RPR	Teste Rápido da Reagina Plasmática
Strep A	<i>Streptococcus</i> do Grupo A
T3	Hormona Triiodotironina Total
T4	Hormona Tiroxina Total
TG	Anticorpo Anti-tiroglobulina
TPO	Anticorpo Anti-tiroperoxidase
TSH	Hormona Estimulante da Tireoide
VCA	Antigénio da Cápside Viral

Resumo

A Citogenética e as Análises Clínicas são dois ramos da biologia que proporcionam as ferramentas mais avançadas para o diagnóstico e acompanhamento de diversas patologias associadas a alterações cromossômicas e à hereditariedade das mesmas. O trabalho prático tem por objetivo o apoio à tomada de decisões clínicas que são sustentadas pelos resultados laboratoriais obtidos por estas técnicas e ferramentas.

Este relatório surge no âmbito do 2º ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio teve lugar em dois locais distintos, no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, durante o período de janeiro a junho, e, durante um mês, entre fevereiro e março no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Este relatório de estágio aborda as diferentes experiências nos dois laboratórios, como é efetuado todo o processo desde a receção de amostras até à obtenção dos resultados, e alguns casos clínicos, focando com mais detalhe as duas valências por mim selecionadas, nomeadamente a Citogenética e a Imunologia.

Palavras-chave: Citogenética, Cromossomas, Análises Clínicas, Diagnóstico, Imunologia.

Abstract

Cytogenetics and Clinical Analysis are two Biology branches that provide the most advanced tools for the diagnosis and monitoring of various pathologies associated with chromosomal alterations, and how these pathologies are inherited. This written work aims to reinforce clinical decision-making as evidenced by laboratory results utilizing these advanced techniques and tools.

This report is required coursework for the 2nd year of the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The curricular internship took place in two different locations: the 1) Clinical Analysis Laboratory of the University of Coimbra, from January to June 2023, and the 2) Cytogenetics and Genomics Laboratory of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra, for one month between February and March 2023. This internship report addresses my experience in these two laboratories, how their processes are carried out - from receiving samples to generating the results, - and some clinical cases specifically focused on two skills that I have selected, Cytogenetics and Immunology.

Keywords: Cytogenetics, Chromosomes, Clinical Analysis, Diagnostics, Immunology.

Relatório de Estágio de Citogenética

I. Introdução

O campo da citogenética humana tem tido uma evolução constante desde a descoberta do número correto de cromossomas nos humanos (46) em 1956. Desde então, o nosso conhecimento acerca da importância das anomalias cromossómicas para saúde e doenças humanas cresceu quase exponencialmente nos últimos 60 anos ¹.

Segundo o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano, citogenética é um ramo da biologia focado no estudo dos cromossomas. Os cromossomas são estruturas microscópicas de cadeias DNA (ácido desoxirribonucleico) e proteínas que contêm a maior parte da informação genética e que residem no núcleo de uma célula. Durante a divisão celular, essas estruturas tornam-se condensadas (metáfase) e são visíveis ao microscópio ².

São usadas técnicas especiais de coloração para avaliar o número e a estrutura dos cromossomas de uma pessoa, sendo que estes podem estar alterados em certas condições genéticas. O estudo pode ser feito em tecidos como o sangue e a medula óssea através da cultura de células em laboratório. A citogenética pode ser usada para ajudar a diagnosticar, planejar um tratamento ou avaliar a eficácia de um tratamento ².

Este estágio decorreu no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC), onde tive a oportunidade de acompanhar todo o processo de estudo citogenético em diagnóstico pré-natal, desde a chegada das amostras até ao envio do relatório final.

O LCG-FMUC efetua regularmente Controlos de Qualidade para os parâmetros de diagnóstico efetuados, participando anualmente em diferentes programas de controlo externo de qualidade do *Genomics Quality Assessment*, obtendo avaliações de grau de excelente, estando adicionalmente certificado pela norma ISO 9001:2015.

O diagnóstico pré-natal é um campo da genética clínica e ginecologia que exemplifica a integração entre a medicina teórica e clínica ³.

O diagnóstico pré-natal invasivo é mais comumente efetuado para avaliar os cromossomas embrionários/fetais ³.

As razões comuns para efetuar um diagnóstico pré-natal são:

- A idade materna: a probabilidade de anomalias cromossómicas aumenta com a idade materna, particularmente >35 anos ⁴;

- Após um resultado anormal de um teste não-invasivo (NIPT) ⁴;
- Após uma descoberta num ultrassom que demonstra a possibilidade de uma anomalia cromossômica ⁴;
- Na presença de uma translocação, inversão ou inserção já conhecida de um dos pais ⁴;
- Resultados anormais dos testes bioquímicos ⁴;
- Abortos de repetição ⁴;
- Múltiplas anomalias no feto ⁴;
- Uma anormalidade cromossômica num filho do casal ³;
- Histórico familiar ⁴.

Como a análise cromossômica requer material celular, a forma de colheita deste vai depender da gestação, da indicação clínica e do risco que a intervenção acarreta ³.

2. Citogenética

Os testes citogenéticos são a análise dos cromossomas para determinar anomalias cromossômicas tais como aneuploidias e anomalias estruturais. Uma célula humana normal contém 23 pares de cromossomas que incluem 22 pares de autossomas e um par de cromossomas sexuais (XX ou XY). Aneuploidia envolve ter um cromossoma ou vários a mais, ou ter cromossomas a menos. Alguns exemplos das aneuploidias mais comuns são o Síndrome de Down (trissomia 21), Síndrome de Edwards (trissomia 18) e Síndrome de Turner (monossomia do X) ⁴.

Alguns exemplos de anomalias estruturais são:

- Duplicação: Parte de um cromossoma está repetida;
- Deleção: Parte de um cromossoma está em falta;
- Translocação: Material entre dois cromossomas diferentes é trocada (esta troca pode ser equilibrada ou desequilibrada);
- Inversão: Parte do cromossoma está invertida dentro do cromossoma;
- Inserção: Adição de material de outro cromossoma ou do mesmo cromossoma ⁴.

Testes citogenéticos podem ser usados em diversas situações. Podem ser usados em casos pré-natais, após testes bioquímicos ou ecografias com alterações como por exemplo anomalias do sistema nervoso central ou aumento da translucência da nuca ⁵. A citogenética também é utilizada em casais com abortos de repetição ou em casais que tenham na sua descendência alterações cromossômicas já conhecidas ⁴.

A maioria das anomalias cromossômicas causam morte pré-natal ou não são compatíveis com a vida. É estimado que aproximadamente 15% das gestações terminem em aborto. Destes 15%, as anomalias cromossômicas são 50-60% dos casos, particularmente aquelas que ocorrem no primeiro trimestre ⁶.

3. Amostras

As amostras para obtenção do cariótipo são diversas, mas as amostras que foram acompanhadas no decorrer deste estágio foram nomeadamente biópsias das vilosidades coriônicas/trofoblastos e amniocentese/ líquido amniótico ⁷.

A amniocentese para obtenção do líquido amniótico é praticada desde a década de 1930. Foi utilizada no início da década de 1950 na avaliação pré-natal da sensibilização ao Rh. A precisão da amniocentese para a detecção de anomalias cromossômicas reconhecidas é superior a 99%, realizando-se esta entre a 15^a e a 24^a semanas de gestação, sendo que a cultura do líquido amniótico é também ótima neste espaço temporal dado que as células crescem rapidamente ⁸. Cerca de 15 mL de líquido amniótico são aspirados. Para análise dos cromossomas é necessário fazer cultura celular, que necessita de crescer durante 1 a 2 semanas ⁴. Posteriormente são analisados os cromossomas em metáfase, tanto numericamente como estruturalmente ³.

A biópsia das vilosidades coriônicas (CVS) é tipicamente efetuada entre a 11^a e a 12^a semanas de gestação. Não deve ser efetuada antes da 11^a semana dado o facto de aumentar o risco de malformações nos membros, possivelmente associados a trauma placentário e obstrução vascular numa fase crítica do desenvolvimento³. São estudadas células do trofoblasto ou culturas de células mesenquimais ⁴.

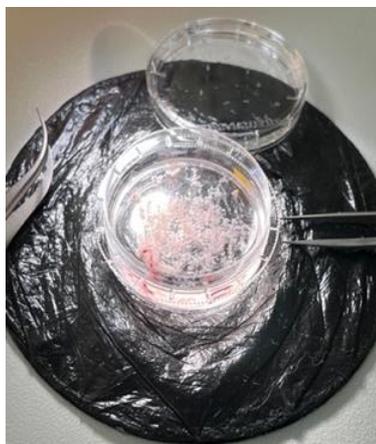


Figura 1 - Amostra de vilosidade coriônicas. Imagem obtida no LCG-FMUC.

4. Procedimento de Cultura Celular para Realizar um Diagnóstico Citogenético

O procedimento de cultura celular com o objetivo de realizar um diagnóstico citogenético varia consoante o tipo de amostra, mas de um modo geral inicia-se com a colheita e identificação das amostras, procede-se à cultura, manipulação celular, bandagem e análise microscópica ⁹.

4.1 Culturas Celulares

Para se fazer um estudo citogenético é necessário ter células em divisão ativa. As culturas devem ser realizadas em condições de assepsia, evitando a contaminação da amostra, sendo que as amostras são transferidas para T-*flasks* com meio de cultura ⁹. O meio de cultura (Gibco® AmnioMAXTM C- 100 Complete Medium) consiste numa solução que contém soro fetal de bovino, gentamicina e L-glutamina para maximizar a fixação e o crescimento celular. Contém também um sistema de tampão que proporciona estabilidade do pH ¹⁰.

Cada amostra deve ser cultivada em pelo menos duas linhas celulares (A e B), com dois meios de cultura distintos, manipuladas por dois técnicos, em câmaras de fluxo laminar diferentes e mantidas em estufas diferentes. No LCG-FMUC, para uma das linhas usam Gibco® AmnioMAXTM C- 100 Complete Medium (meio completo) e na outra linha usam Ham's F-10 Nutrient Mix, que contém aminoácidos, glucose, sais, vitaminas e nutrientes. Para se tornar um meio completo, tem de se acrescentar L-glutamina, antibióticos e soro fetal de bovino. As duas linhas são muito importantes para descartar situações de fenómenos de cultura que possam surgir numa das linhas ¹¹.

4.1.1 Manutenção das culturas celulares

As culturas devem ser mantidas em sistema aberto, isto é, os T-*flasks* não ficam completamente rolhados, permitindo haver trocas gasosas dentro da incubadora. As incubadoras têm temperaturas controladas (37°C) para o crescimento celular, humidade constante que previne a evaporação do meio, O₂ para a respiração e CO₂ para a manutenção do pH no meio de cultura ¹¹.

As culturas de líquido amniótico e de vilosidades coriônicas, demoram entre uma a duas semanas a crescer. O crescimento tem de ser monitorizado periodicamente através do microscópio de contraste de fase, até que as culturas estejam confluentes, com células em divisão que apresentam um aspeto redondo e mais brilhante, indicando que a cultura está pronta a manipular. A confluência desejada para manipular é de 60-70%. Durante o período de crescimento, o meio pode ficar deficiente em nutrientes, situação que conseguimos observar dado que o meio é avermelhado e passa a amarelo com a acidificação (tem indicador de pH). Nestas situações deve-se renovar o meio ¹¹.

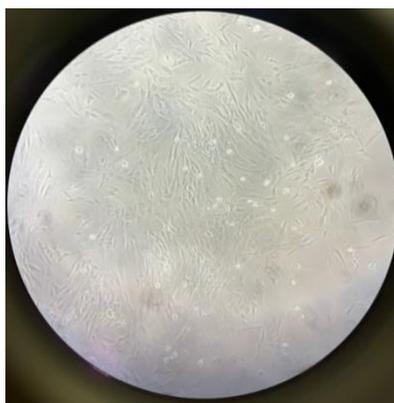


Figura 2 - Observação da confluência das células. Imagem obtida no LCG-FMUC.

4.2 Manipulação Celular

Quando se observa no microscópio invertido de contraste de fase T-*flasks* com 60-70% de confluência e células em divisão, inicia-se o processo de manipulação ¹¹.

O bloqueio do ciclo celular de células em divisão é essencial para a identificação e análise dos cromossomas. Assim, a manipulação celular consiste na paragem das células em metáfase, tratamento hipotónico, fixação e espalhamento em lâmina para posterior bandagem e análise microscópica ⁹.

A única forma de obter um número suficiente de metáfases de alta qualidade é ter muitas células em divisão ativa. Durante a metáfase da mitose, os cromossomas atingem o seu nível máximo de condensação tornando-se identificáveis ao microscópio ¹².

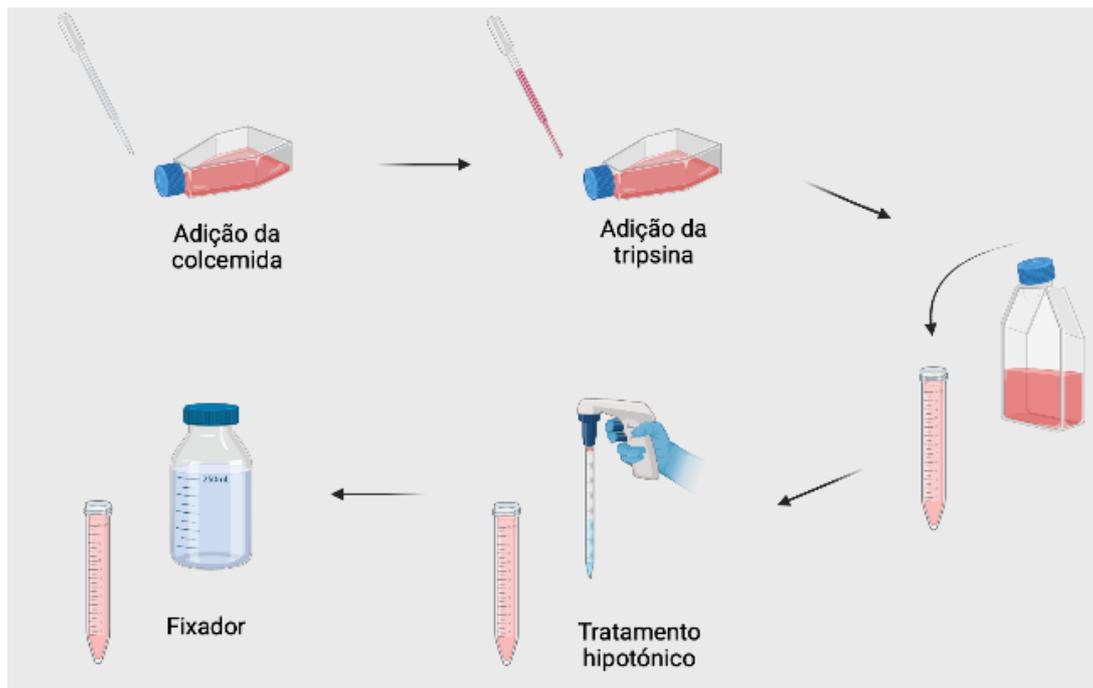


Figura 3 - Representação esquemática do processo de manipulação celular ⁹. Imagem adaptada e ilustração criada no site BioRender.

Inicia-se então a manipulação, adicionando colcemida que é um inibidor mitótico utilizado no processo de cultura celular, impede a formação do fuso acromático, não há a separação dos cromátides irmãos em anáfase e conseqüentemente o ciclo celular é interrompido em metáfase ^{9,13}.

O tratamento prolongado com colcemida aumenta o índice mitótico, mas o tratamento prolongado leva a uma maior fração de células com os cromossomas encurtados, ficando mais condensados ¹². Após esta incubação, observamos os T-*flasks* ao microscópio para garantir que temos células suficientes a dividir ¹¹.

Posteriormente é efetuado o processo de tripsinização. A tripsina é usada para remover as células aderentes da superfície da placa de cultura ¹⁴. É feita uma suspensão das células que vai ser transferida para *falcons* devidamente identificados ¹¹, sendo depois efetuado o tratamento hipotônico. A solução hipotônica, cloreto de potássio (KCl), faz com que a água entre nas células por osmose, turgindo as membranas celulares e separando os cromossomas, tornando-os mais fáceis de visualizar ⁸. O objetivo não é que as células rebentem durante o choque hipotônico, mas que turjam o suficiente para apenas rebentarem quando do espalhamento na lâmina ¹¹. Esta é uma etapa importante para o correto espalhamento dos cromossomas, pois permite uma menor sobreposição, melhor visualização e análise dos cromossomas. O tempo de exposição à solução hipotônica é uma etapa crítica dado que, um

tempo de exposição elevado, vai levar a lise e um baixo tempo de exposição não leva ao turgimento das células, originando um espalhamento de má qualidade ⁹.

O fixador é uma mistura de metanol absoluto e de ácido acético glacial. Este é adicionado às células com solução hipotónica, parando a ação da solução e fixando as células túrgidas ¹⁵.

O último passo da manipulação é assim designado de espalhamento. Uma boa análise cromossómica tem por base um bom espalhamento, com boa quantidade de metáfases, bem espalhadas pela lâmina, com poucos cromossomas sobrepostos e as células sem citoplasma ¹⁵. Para tal, são colocadas duas gotas de 10 µL cada numa lâmina, bem separadas entre si ⁹. As variáveis que influenciam o espalhamento são essencialmente a temperatura e a humidade daí o espalhamento ser efetuado numa câmara com temperatura e humidade controladas ¹⁵.

Outras variáveis que influenciam o espalhamento são: o uso de lâminas molhadas em vez de lâminas secas, a duração do tratamento hipotónico, o fluxo de ar, entre outras ¹⁵.



Figura 4 - Exemplo de câmara de espalhamento e temperatura controladas (Thermotron)¹⁶

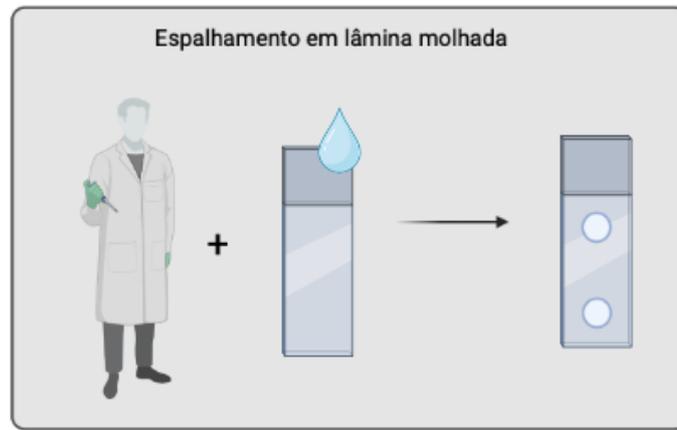


Figura 5 - Espalhamento em lâmina molhada. Ilustração criada no site BioRender.

Posteriormente, as lâminas são observadas num microscópio de contraste de fase para se avaliar a qualidade do espalhamento ¹⁵. O objetivo é ter uma quantidade suficiente de metáfases, bem espalhadas na lâmina, com pouca sobreposição de cromossomas e sem citoplasma ¹¹.



Figura 6 - Observação da qualidade do espalhamento. Imagem obtida no LCG-FMUC.

Após a confirmação de um bom espalhamento, as lâminas são envelhecidas numa estufa a temperaturas elevadas para desidratar os cromossomas, favorecendo a bandagem cromossômica ¹⁵.

4.3 Bandagem

A bandagem cromossômica é uma técnica essencial usada na obtenção de um cariótipo permitindo estudar os cromossomas. As bandagens Giemsa (G), Reversa (R) e Centrômero (C) são as técnicas de bandagem cromossômica mais comuns. A bandagem G envolve a coloração de cromossomas tratados com tripsina, a bandagem R envolve a desnaturação em ácido salicílico quente seguida de coloração com Giemsa. A bandagem C é especificamente

usada para identificar heterocromatina, desnaturando os cromossomas numa solução alcalina saturada fazendo posterior coloração com Giemsa. Diferentes técnicas de bandagem podem ser escolhidas para a identificação de cromossomas ¹⁷.

4.3.1 Bandagem GTL (Bandas G, usando Tripsina e corante Giemsa/Leishman)

A bandagem GTL é a mais utilizada dado ser a mais simples e as lâminas manterem-se conformes durante longos períodos ¹⁵.

É utilizada uma enzima proteolítica denominada de tripsina, que digere os cromossomas e desnatura as proteínas, permitindo a distinção das diferentes bandas cromossômicas através da coloração com corante de Leishman. Obtém-se um padrão alternado de bandas claras e escuras ao longo do cromossoma e são essas bandas que permitem a sua diferenciação e identificação. Tendencialmente, as bandas claras contêm DNA rico em guanina-citosina correspondendo a regiões ricas em genes enquanto as bandas escuras contêm DNA rico em adenina-timina, correspondendo a regiões de heterocromatina. A tripsina é um passo limitante nesta coloração dado que demasiado tempo de exposição à tripsina forma um padrão de bandas demasiado translúcido e pouco tempo de exposição origina bandas demasiado escuras e indistinguíveis ⁹.

Após a exposição à tripsina, as lâminas são lavadas em solução salina e tampão GURR, são depois coradas sendo novamente lavadas com uma solução tampão GURR e água destilada ⁹.



Figura 7 - Cromossomas corados com bandagem GTL. Imagem obtida no LCG-FMUC.

4.4 Análise microscópica

Após a bandagem, as lâminas são analisadas num microscópio de campo claro, conseguindo-se desta forma detetar anomalias numéricas e/ou estruturais. Para tal, as lâminas são analisadas, campo a campo, encontrando as metáfases. Após o seu encontro, a metáfase

tem de ser estudada para ver se está completa, se há cromossomas sobrepostos e se os cromossomas estão com boa qualidade. Todo este processo é efetuado na objetiva de imersão (100x). Posteriormente é captada uma imagem da metáfase e os cromossomas são organizados em cariógramas e analisados ¹⁵.

O laboratório tem protocolos para os critérios de análise. Células incompletas não devem ser incluídas na análise. A análise das metáfases envolve a comparação de cada conjunto de cromossomas homólogos, incluindo os cromossomas X e Y, banda a banda. Se um dos pares de homólogos estiver sobreposto com outro cromossoma, o par deve ser observado noutra metáfase para garantir que não há rearranjos estruturais. Assim, mais células devem ser contadas e analisadas para completar o estudo. A análise deve ser realizada por um técnico treinado. Existe um número mínimo de metáfases que devem ser analisadas dependendo do tipo de tecido. Em geral, devem ser analisadas duas metáfases, no mínimo, para análise constitucional, sendo que na prática são analisadas e contadas mais metáfases para evitar quaisquer sobreposições (cerca de 20). Deve ser efetuada uma segunda análise independente por um analista ^{18,19}.

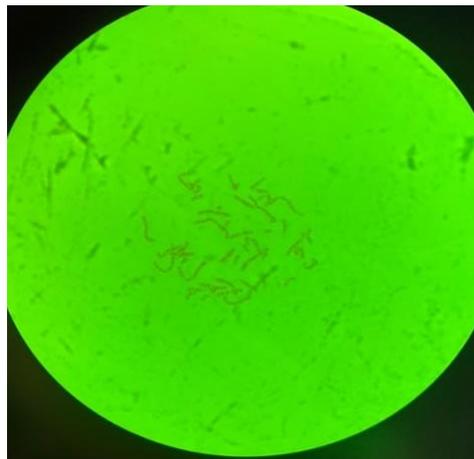


Figura 8 - Imagem dos cromossomas observados ao microscópio. Imagem obtida no LCG-FMUC.

5. Cariótipos

Cariotipagem é o método escolhido para detetar anomalias estruturais e numéricas. Deleções, duplicações, translocações equilibradas ou desequilibradas, inserções e inversões são exemplos de anomalias estruturais. As anomalias mais comuns incluem trissomias dos cromossomas 13, 16, 18 ou 21, e monossomias, triploidia ou tetraploidia do cromossoma X.

Na cariotipagem os autossomas são divididos pelo seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas ¹⁹.

6. Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN)

Uma nomenclatura *standard* é crítica para a descrição precisa e consistente das alterações genómicas identificadas no cariótipo. O ISCN é a referência central para a descrição dos resultados do cariótipo, e fornece regras para descrever achados citogenéticos em relatórios laboratoriais ²⁰.

7. Relatórios Laboratoriais

São documentos para o médico responsável e devem ser claros, precisos e conter todas as informações relevantes para uma boa interpretação dos achados citogenéticos ²⁰.

7.1 Tempo até obter o relatório

O tempo que o laboratório demora a lançar um relatório deve ser o mais curto possível. Devem ter também em consideração a razão pelo qual estão a fazer este estudo e o nível de urgência. O tempo recomendado para o lançamento do relatório depende do tipo de amostras sendo que, líquidos amnióticos e culturas de longo prazo de CVS demoram no máximo 17 dias e culturas de curto prazo de CVS 7 dias ¹⁸.

8. Componente Prática

Este estágio no Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC permitiu a aquisição de diversos conhecimentos e competências práticas dentro da área de citogenética pré-natal. Inicialmente foi disponibilizado material de estudo para a integração de conhecimentos teóricos fundamentais para toda a prática clínica. De seguida foram igualmente disponibilizados diversos cariótipos originários de fotografias retiradas de imagens ao microscópio para que fosse mais fácil a familiarização aos diversos cromossomas e a capacidade de os distinguir. Posteriormente, passou-se à componente prática, onde houve a oportunidade de observar, todo o processo desde a chegada das amostras até à obtenção do cariótipo. No fim do estágio foram cedidos dois casos clínicos para fazer o estudo destes e os apresentar, os quais se encontram no final deste relatório.

9. Conclusão

O estágio curricular realizado no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, durante um mês, foi sem dúvida uma mais-valia que permitiu ganhar novas competências profissionais. Foi uma oportunidade excepcional poder acompanhar e participar na rotina diária do laboratório.

Durante o estágio, houve a oportunidade de realizar autonomamente a avaliação da confluência das culturas celulares, o espalhamento, a bandagem GTL, a análise microscópica, a captação e edição de metáfases no *software*, a montagem de kariogramas e a descrição dos respetivos kariótipos utilizando a nomenclatura ISCN.

Houve também a possibilidade de acompanhar a cultura e manipulação de amostras de vilosidade coriônicas e líquidos amnióticos.

A aprendizagem incluiu o conceito de diagnóstico pré-natal, uma área de enorme sensibilidade, onde existe um grande rigor e competência por parte de todos os colaboradores do laboratório, dado que os resultados acarretam muitas vezes decisões definitivas e de extrema dificuldade para os pais.

O diagnóstico pré-natal oferece a oportunidade de gerir doenças congénitas, facultando aos pais a oportunidade de terem aconselhamento acerca das expectativas de uma dada doença congénita, sendo revistos os riscos fetais e maternos, podendo ou não tomar a decisão de dar seguimento à gravidez. As assistências adequadas para uma criança com uma doença congénita incluem triagem para defeitos cardíacos, avaliações auditivas e visuais e educação especializada, que podem não ser oferecidas adequadamente sem um diagnóstico oportuno ¹⁹.

As colaborações entre instituições resultam sempre em melhores oportunidades de partilha de conhecimentos sendo sem dúvida enriquecedor a participação num estágio no LCG-FMUC.

10. Casos Clínicos

Caso Clínico I

Senhora de 39 anos, grávida de 16 semanas, dirige-se ao hospital para fazer uma ecografia. Na ecografia é detetada translucência da nuca elevada (no primeiro trimestre de gestação, há uma acumulação subcutânea de líquido no pescoço do feto, que é visualizada na ecografia como uma translucência da nuca²¹) e cardiopatia. É feita uma amniocentese para colheita do líquido amniótico e é solicitado um estudo citogenético.



Figura 9 - Cariótipo Caso Clínico I.

O cariótipo representado na Figura 9 é ISCN (2020): 46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21

Indica então que se tem um feto do sexo feminino, com 46 cromossomas, apresenta uma translocação robertsoniana entre os cromossomas 14 e o 21, apresentando uma trissomia 21 (Síndrome de Down).

Translocações robertsonianas são um tipo muito comum de rearranjos dos cromossomas, que envolvem os cromossomas acrocêntricos²².

A nível da recorrência, cerca de $\frac{1}{4}$ das Síndromes de Down por translocações robertsonianas são familiares e $\frac{3}{4}$ são *de novo*. Nas situações familiares, um dos pais (quase sempre a mãe) tem uma translocação equilibrada que foi transmitida ao feto de forma desequilibrada. Nas translocações *de novo*, ambos os pais têm cromossomas normais. Estas situações são raras e, na maioria das famílias, não se observam recorrências²³.

Os progenitores devem ser encaminhados para uma consulta de genética médica, onde toda a informação lhes deve ser transmitida com linguagem acessível de forma que consigam tomar uma decisão informada.

Deve ser ainda feito um estudo do cariótipo dos pais para perceber se é uma translocação robertsoniana *de novo* ou familiar. Se for familiar deve-se proceder ao estudo dos familiares que estejam interessados. Os portadores geneticamente equilibrados destas translocações têm uma maior incidência de infertilidade, bem como um risco aumentado de desequilíbrios genéticos na sua descendência ²².

Caso Clínico 2

Senhora de 45 anos, grávida de 13 semanas, dirige-se ao hospital para fazer uma ecografia. O médico deteta atraso de crescimento intrauterino, agenesia do corpo caloso, mielomeningocele, quistos plexos coroides, pés botos, hérnia diafragmática e onfalocelo. É feita uma biópsia das vilosidades coriônicas e é solicitado um estudo citogenético.

Notas:

Agenesia do corpo caloso – É uma doença em que o tecido que liga os lados esquerdo e direito do cérebro está parcial ou totalmente ausente. É causada por uma perturbação da migração das células cerebrais durante o desenvolvimento fetal. (25)

Mielomeningocele – É o tipo mais grave de espinha bífida. Nesta condição, há um saco de fluido nas costas do bebé. Parte da medula espinhal e dos nervos encontram-se nesse saco e ficam danificados. Causa deficiências moderadas a graves, tais como problemas que afetam a forma como a pessoa vai à casa de banho, perda de sensibilidade nas pernas ou pés e incapacidade de mover as pernas. (26)

Quistos plexos coroides – O plexo coroide é a parte do cérebro que produz líquido cefalorraquidiano. Em cerca de 1-2% dos bebés, uma pequena bolha de líquido é comprimida à medida que o plexo coroide se forma, aparecendo como um quisto no interior do plexo coroide no momento da ecografia. (27)

Pés botos – Descreve uma série de anomalias do pé, geralmente congénitas, em que o pé do bebé está torcido e fora de forma ou posição. Os tendões são mais curtos que o habitual. (29)

Hérnia diafragmática – É um defeito de nascença em que existe um orifício no diafragma. Os órgãos do abdómen como os intestinos, o estômago e o fígado, podem deslocar-se através do orifício no diafragma e sobem para o peito. Quando um órgão atravessa o orifício, denomina-se hérnia. Esta pode impedir que os pulmões do bebé se desenvolvam completamente, causando dificuldades respiratórias à nascença. (30)

Onfalocelo – É um defeito de nascença da parede abdominal. Os intestinos, o fígado ou outros órgãos do bebé ficam fora da barriga através do umbigo. Os órgãos estão cobertos por um saco fino, quase transparente, que quase nunca se abre ou rompe. (28)



Figura 10 - Cariótipo Caso Clínico 2.

O cariótipo representado na figura 10 é ISCN (2020): 47,XX,+18

Indica que se tem um feto, do sexo feminino, que contém um cromossoma a mais, o cromossoma 18, apresentando uma trissomia 18, também denominada Síndrome de Edwards.

A nível da recorrência, a trissomia 18 ocorre por um fenómeno de não disjunção na gametogénese, não sendo comum haver mais filhos com a mesma doença. Tem de se ter em consideração que a mãe tem 45 anos, idade materna avançada, e é um dos fatores que exponenciam o aparecimento deste tipo de aneuploidias^{23,24}.

Os progenitores devem ser encaminhados para uma consulta de genética médica, onde toda a informação lhes deve ser transmitida com linguagem acessível de forma que consigam tomar uma decisão informada.

A trissomia 18 esta associada a elevadas taxas de mortalidade, estimadas em 75-95% no primeiro ano de vida, bem como a uma morbilidade significativa nos sobreviventes. A baixa sobrevivência deve-se à elevada prevalência de anomalias congénitas graves nos bebés com este diagnóstico, estando também associada a abortos espontâneos e a interrupções da gravidez após o diagnóstico pré-natal^{24,25}.

Relatório de Estágio no LACUC

I. Introdução

O Mestrado em Análises Clínicas tem por base fornecer conhecimento na área do diagnóstico laboratorial feito com base em duas componentes, a componente teórica conseguida através de várias unidades curriculares e a componente prática com um estágio curricular.

O estágio teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) sob a orientação da Professora Doutora Ana Miguel Matos.

Sendo um laboratório pequeno, o estagiário tem a possibilidade de acompanhar todas as amostras e todos os processos, desde a colheita até à obtenção dos resultados. Inicia-se o estágio pela familiarização com o programa onde é lida a prescrição e onde todos os resultados vão confluír. De seguida é feito o acompanhamento das colheitas e posteriormente é feito o acompanhamento das determinações analíticas e a inserção dos resultados no sistema informático. É dada a liberdade ao estagiário para se tornar independente no trabalho sempre com um elevado sentido de responsabilidade associado.

Neste relatório são abordadas as diversas análises efetuadas no LACUC, desde os aparelhos às técnicas manuais, dando principal foco à área de imunologia.

2. Caracterização do LACUC

O LACUC, é um laboratório focado na comunidade estudantil e todos os que trabalham no âmbito da Universidade. Apesar de ser um laboratório criado em 1983, houve, recentemente, uma mudança para novas e mais modernas instalações. O LACUC localiza-se no Pólo I, no antigo edifício da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Este laboratório é focado na excelência dos resultados que transmite, tendo também por objetivo a formação de estudantes e o apoio à investigação.

O espaço físico do LACUC inclui receção, sala de colheitas, laboratório core 1, laboratório core 2, sala da microbiologia, sala de lavagens, sala de pré-PCR, sala de PCR 1, sala de PCR 2, sala de apoio e gabinete.

A equipa do laboratório é composta por uma Diretora Técnica, uma Diretora Técnica Adjunta, duas Técnicas Superiores de Saúde e duas Assistentes Técnicas.

Este laboratório tem também como valências a hematologia, microbiologia, imunologia, bioquímica e biologia molecular. Sendo um laboratório de pequenas dimensões e com poucas amostras, os estudantes têm a oportunidade de acompanhar todas as valências em simultâneo, dado não haver separação entre os diversos setores.

3. Amostras

O LACUC colhe, recebe, trabalha e analisa diversos tipos de amostras biológicas como soro, plasma, sangue total, fezes, urina, exsudatos vaginais, faríngeos e nasais. Todas as amostras são tratadas e acondicionadas segundo as regras de segurança e higiene, evitando a contaminação do manipulador e do ambiente e mantendo sempre a qualidade da amostra.

As amostras são recebidas em área própria do laboratório, sendo acompanhadas pelos respetivos pedidos e por um código interno que referencia o nome do utente e o número de processo. É posteriormente avaliada a qualidade da amostra que se baseia na sua análise macroscópica. Amostras com baixo volume, mal colhidas, amostras de sangue com coágulos, amostras de soro ou plasma hemolisadas ou outras situações em que se observe que a amostra não está conforme, é feito o contacto com o utente para nova colheita ²⁶.

4. Controlo de Qualidade

Segundo o manual de Sistema de Gestão de Qualidade da Organização Mundial de Saúde, a qualidade laboratorial pode ser definida como precisão, fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados dos testes reportados ²⁷.

Os erros de laboratório podem ter efeitos significativos na qualidade do cuidado com o utente. Estes erros podem afetar a confiança do utente perante o laboratório. A maioria dos erros ocorre nas fases pré-analítica e pós-analítica ²⁸.

Controlo de qualidade é definido como o “conjunto das técnicas e atividades de carácter operacional utilizadas com vista a responder às exigências da qualidade.”²⁹

O Controlo de Qualidade laboratorial é feito através do Controlo de Qualidade Interno (CQI) que avalia a precisão analítica e através de programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) que avaliam a exatidão analítica ³⁰.

O Controlo de Qualidade Externo é indispensável para que o laboratório seja comparável aos restantes laboratórios da comunidade ²⁹. No LACUC, o AEQ é feito através do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial, coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, que disponibiliza diversos programas nas

mais diversas áreas laboratoriais. A participação nestes programas permite que os laboratórios monitorizem e implementem a melhoria da qualidade analítica ³¹.

O Controlo de Qualidade Interno faz parte da vida diária do laboratório. Logo após a abertura do laboratório são efetuadas as manutenções diárias de todos os aparelhos. Concluída a fase de manutenção, é verificada a necessidade de se efetuarem calibrações e sendo posteriormente efetuados os controlos diários. Tanto as calibrações como os controlos diários são diferentes entre aparelhos, mas têm por base a garantia de que o resultado final, dado ao utente, seja o mais exato possível. Há ainda aparelhos que para além das manutenções diárias, também necessitam de manutenções semanais, mensais e trimestrais.

5. Imunologia

O sistema imunitário é composto por uma complexa rede de órgãos primários e secundários que regulam e produzem uma vasta variedade de células efectoras através das quais são produzidas largas quantidades de proteínas (anticorpos) e compostos químicos que formam uma complexa linha de defesa contra agentes invasores estranhos como bactérias, vírus, parasitas e fungos ³².

O processo imunológico está dependente de uma cadeia de sinalização celular e molecular específica a cada tipo de infeção, o qual está diretamente relacionado com o tipo de agente etiológico. A partir do conhecimento desta maquinaria celular, e consequentes estruturas moleculares, é possível desenhar modelos de diagnóstico e terapêutica na qual se baseiam muitos protocolos de Análises Clínicas.

Muitas das determinações realizadas em Laboratórios de Análises Clínicas assentam na reação entre um antígeno (Ag) e um anticorpo (Ac) que lhe é específico. A forma como a deteção do complexo Ag-Ac é obtida varia de equipamento para equipamento e de método para método.

5.1 Architect i1000

Como referido anteriormente, o LACUC é um laboratório de pequenas dimensões, pelo que, a maioria da imunologia é efetuada por sistemas automáticos. Os sistemas automáticos utilizados são o Architect i1000 do Laboratório Abbott e o VIDAS do Laboratório Biomerieux. Para além destes aparelhos, o LACUC contém ainda diversos testes que se baseiam em reações imunológicas como o teste das RPR, teste de gravidez, teste rápido de COVID-19, tipagem sanguínea, teste de Coombs indireto e ainda a pesquisa de sangue oculto nas fezes.

O Architect i1000 é um aparelho onde podem ser analisadas amostras de soro, plasma, sangue total e urina, podendo ser inseridas até 65 amostras de cada vez ³³.

O método utilizado para a execução das análises é o imunoenensaio baseado em reações de quimioluminescência ³⁴.

O imunoenensaio por quimioluminescência é uma técnica em que o marcador, ou seja, o verdadeiro "indicador" da reação analítica, é uma molécula quimioluminescente. Em geral, a luminescência é a emissão de radiação visível ou quase visível ($\lambda = 300-800$ nm) que é gerada quando um eletrão transita de um estado excitado para o estado fundamental. A energia potencial resultante no átomo é libertada sob a forma de luz ³⁵. Os reagentes desta reação são micropartículas paramagnéticas que estão revestidas com um anticorpo/antigénio (conjugado com acridínio que é a molécula quimioluminescente), específico do analito a detetar na amostra, uma solução pré-ativadora e uma solução ativadora ^{34,36}.

A reação tem início com a adição das micropartículas à cuvete onde se encontra a amostra e o anticorpo/antigénio que reveste as micropartículas liga-se ao analito na amostra. Posteriormente as micropartículas são atraídas para as paredes da cuvete por um íman e há uma lavagem da cuvete onde apenas permanecem os componentes que se ligaram às micropartículas. De seguida, o anticorpo marcado com acridínio é adicionado à cuvete, ligando-se ao anticorpo/antigénio que se quer detetar na amostra. É adicionada a solução pré-ativadora contendo peróxido de hidrogénio sendo que previne a emissão prematura de luz por criar um ambiente ácido. O peróxido de hidrogénio também impede a aglomeração das micropartículas e separa o acridínio conjugado das micropartículas que se encontram ainda atraídas pelo íman, na parede da cuvete. Na solução permanecem então as moléculas de acridínio conjugadas com o anticorpo/antigénio que está a ser pesquisado. Posteriormente é adicionada a solução ativadora composta por hidróxido de sódio que provoca a alcalinização do meio, levando à oxidação da acridínio e por sua vez há emissão de luz. É medida a emissão de luz pelo sistema ótico do equipamento por um período predefinido, permitindo quantificar o analito na amostra ^{34,36}.

Os parâmetros medidos neste aparelho são Hormona Triiodotironina Total (T3), Hormona Estimulante da Tireoide (TSH), Anticorpo Anti-tiroglobulina (TG), Anticorpo Anti-tiroperoxidase (TPO), Gonadotrofina Coriónica Humana Beta (β HCG), Estradiol, Hormona Folículo-Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Prolactina, Testosterona Total, Antigénio Específico da Próstata (PSA) Livre, PSA Total, Vitamina B12, IgG, Folato, Vitamina

D, Ferritina, Hormona Triiodotironina Livre (FT3), Hormona Tiroxina Total (T4), Hormona Tiroxina Livre (FT4) e Progesterona.

5.1.1 Marcadores Tumorais

Segundo o Instituto Nacional do Cancro, um marcador tumoral é um elemento presente ou produzido pelas células cancerígenas ou por outras células do organismo em resposta ao cancro ou a determinadas condições benignas (não cancerígenas) que fornece informações sobre o cancro, como a sua agressividade, se pode ser tratado com terapia dirigida ou se está a responder ao tratamento ³⁷.

Antigénio Específico da Próstata (PSA), trata-se de uma glicoproteína com função de enzima, produzida quase exclusivamente pelas células epiteliais da próstata, que tem como função tornar o esperma mais líquido. Existe no esperma, nas células da próstata e no sangue periférico, pelo que um aumento da PSA no sangue periférico pode indicar cancro da próstata³⁸.

5.1.2 Hormonas da tiroide

A tiroide é uma pequena glândula em forma de borboleta situada na parte da frente do pescoço e que produz e liberta hormonas. As hormonas são substâncias químicas que coordenam diferentes funções do organismo, transportando mensagens através do sangue para os órgãos, músculos e tecidos ³⁹.

As hormonas tiroideias são hormonas que controlam o metabolismo, processo pelo qual o organismo transforma os alimentos em energia. As duas hormonas principais que a tiroide liberta são a hormona tiroxina (T4) e a hormona triiodotironina (T3). A produção e libertação destas hormonas é controlada por um processo de feedback que se inicia no hipotálamo libertando a hormona libertadora da tireotrofina (TRH) que vai estimular a glândula pituitária ou hipófise a produzir e libertar a hormona estimulante da tiroide (TSH). A TSH desencadeia a produção da T3 e da T4 pela tiroide. É libertada uma quantidade muito maior de T4 do que de T3. Esta reacção hormonal em cadeia é regulada por um ciclo de *feedback*, de modo que quando os níveis de T3 e T4 aumentam, inibem a libertação de TRH (e, conseqüentemente, de TSH). Quando os níveis de T3 e T4 decrescem, o ciclo de *feedback* começa novamente. Este sistema permite que o corpo mantenha um nível constante de hormonas da tiroide. Se houver algum problema com o hipotálamo, a glândula pituitária ou a tiroide, isso pode resultar num desequilíbrio das hormonas envolvidas neste sistema, incluindo a T3 e a T4 ³⁹.

O estudo da T3 é utilizado para ajudar a diagnosticar problemas da tiroide como o hipertiroidismo (quando a tiroide produz demasiadas hormonas tiroideias). A T3 e a T4 têm duas formas, a ligada e a livre. A forma ligada encontra-se ligada a uma proteína e a forma livre não. Assim, a quantificação da T3 e T4 livres (FT3 e FT4) mede apenas a fração livre enquanto a quantificação da T3 e T4 totais mede tanto a fração livre como a fração ligada a proteínas. Apenas as frações livres podem ser usadas pelos órgãos ⁴⁰. A amostra utilizada para estes estudos é o soro.

5.1.3 Autoanticorpos da tiroide

A peroxidase da tiroide é uma enzima que se encontra normalmente na glândula tiroideia, onde desempenha um papel importante na produção de hormonas da tiroide.

Os anticorpos anti-tiroperoxidase (TPO) são dirigidos contra a peroxidase e são o estudado no laboratório ⁴¹.

Tiroglobulina é uma proteína produzida nas células da tiroide, tanto cancerígenas como não cancerígenas. Desempenha um papel fundamental ao ajudar o organismo a produzir, armazenar e libertar as hormonas da tiroide. Os anticorpos anti-tiroglobulina (TG) são dirigidos contra a tiroglobulina e são o estudado no laboratório ⁴².

Os anticorpos anti-tiroglobulina (TG) são utilizados principalmente para confirmar uma suspeita diagnóstica de tiroidite de Hashimoto, e são normalmente solicitados em conjunto com os anticorpos anti-tiroperoxidase (TPO). Os anticorpos TG são menos comuns e de título mais baixo do que os anticorpos TPO. Considerando que a maioria dos doentes com tiroidite de Hashimoto tem anticorpos TPO e/ou TG, um resultado negativo de anticorpos praticamente exclui o diagnóstico de tiroidite, pelo que o teste tem um elevado valor preditivo negativo ⁴³.

Pelo contrário, um anticorpo positivo não é diagnóstico de tiroidite de Hashimoto porque os anticorpos TG são encontrados em várias outras doenças. Estão presentes em cerca de 50% dos casos de doença de Graves, 20% dos casos de bócio não tóxico e de cancro da tiroide, e também em indivíduos normais, especialmente em mulheres idosas. Os anticorpos TG também são encontrados em doenças autoimunes não tiroidianas, como doença celíaca e diabetes tipo I, um achado que sugere que a autoimunidade tiroideia é mais prevalente do que a tiroidite de Hashimoto propriamente dita. O título dos anticorpos TG não se correlaciona normalmente com o grau de disfunção da tiroide ⁴³. A amostra utilizada para estes estudos é o soro.

5.1.3.1 Caso Clínico

Caso Clínico: Senhora de 22 anos apresenta análises de rotina com hemograma, bioquímica, endocrinologia e estudo sumário de urina. O hemograma, a bioquímica e o estudo sumário de urina apresentam valores normais. Os valores da endocrinologia apresentam-se na Tabela I.

Tabela I - Endocrinologia do Caso Clínico I

Endocrinologia	Resultados	Unidades	Valores de Referência
Tiroxina Livre (FT4)	0,88	ng/dL	0,70 – 1,48
H. Tiroestimulante (TSH)	1,566	μUI/mL	0,350 – 4,940
Anticorpos Anti-Tiroglobulina (TG)	71,2	UI/mL	< 4,1
Anticorpos Anti-Peroxidase (TPO)	24,31	UI/mL	< 5,61

Como podemos observar esta senhora apresenta os valores de TG e TPO elevados, mas apresenta FT4 e TSH com valores normais. Sendo que ainda não tem sintomatologia, o médico tem de fazer um controlo destes valores, podendo também fazer uma ecografia à tiroide, sob o risco de a senhora vir a desenvolver uma tiroidite autoimune (dado que tem os anticorpos elevados), como a tiroidite de Hashimoto.

5.1.4 Hormonas da reprodução

Estradiol é a forma de estrogénio produzida principalmente pelos ovários. Desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino incluindo o útero, as trompas de Falópio, a vagina e os seios. As mulheres têm maiores quantidades de estradiol durante os anos reprodutivos e quase nenhum após a menopausa ⁴⁴. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Hormona folículoestimulante (FSH), é uma hormona produzida na glândula pituitária. Nos homens a FSH encontra-se nas células dos testículos e é responsável pela produção de esperma e nas mulheres encontra-se nos ovários e estimula o crescimento de óvulos durante o ciclo menstrual. Nas crianças, a FSH é importante para o desenvolvimento sexual. É estudada para perceber se glândula pituitária está a funcionar corretamente, ou se há problemas nos ovários ou testículos. No caso das mulheres, os valores de referência variam com a fase do ciclo menstrual e pode ser útil para confirmar a menopausa ⁴⁵. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Hormona luteinizante (LH), é produzida na glândula pituitária, sendo que nas mulheres atua durante a ovulação menstrual fazendo com que os ovários libertem óvulos maduros e nos homens faz com que os testículos produzam testosterona. A sua quantificação pode ser útil na investigação de causa de problemas de fertilidade tanto em mulheres como em homens. Um nível elevado de LH ajuda a mulher a perceber o momento do ciclo em que é mais fácil engravidar. O teste ajuda também a diagnosticar problemas na glândula pituitária ⁴⁶. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Prolactina é uma hormona produzida pela glândula pituitária. Em mulheres grávidas estimula a produção de leite. Este estudo também pode ser feito para avaliar a possibilidade de prolactinomas tanto em mulheres como em homens ⁴⁶. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Testosterona é uma hormona sexual masculina que contribui para o desenvolvimento das características masculinas. É produzida nos testículos dos homens, nos ovários das mulheres e nas glândulas suprarrenais. A testosterona total mede o somatório da testosterona ligada a proteínas e da livre ⁴⁷. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Progesterona é uma hormona produzida pelos ovários após a ovulação. O seu papel principal é preparar o útero para receber, implantar e sustentar um óvulo fertilizado durante a gravidez ⁴⁸. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Gonadotrofina Coriônica Humana Beta (β hCG) é uma substância química produzida pelo tecido trofoblástico, um tecido que se encontra normalmente nos embriões e que acaba por fazer parte da placenta. A medição da β hCG pode ser útil para identificar uma gravidez normal, uma gravidez patológica e também pode ser útil após aborto. A medição da β hCG também é utilizada numa variedade de cancros, como coriocarcinoma e tumores de células germinativas. As amostras utilizadas são soro e urina ⁴⁹.

5.1.4.1 Caso Clínico

Caso Clínico: Senhora de 20 anos apresenta análises de rotina com hemograma, bioquímica e endocrinologia. O hemograma e a bioquímica apresentam valores normais. Os valores da endocrinologia apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Endocrinologia do Caso Clínico 2

Endocrinologia	Resultados	Unidades	Valores de Referência
Tiroxina Livre (FT4)	0,99	ng/dL	0,70 – 1,48
H. Tiroestimulante (TSH)	3,191	μUI/mL	0,350 – 4,940
Anticorpos Anti-Tiroglobulina (TG)	22,3	UI/mL	< 4,1
Anticorpos Anti-Peroxidase (TPO)	0,58	UI/mL	< 5,61
H. Foliculoestimulante (FSH)	5,89	mUI/mL	Fase Folicular: 3,03 – 8,08 Meio do ciclo: 2,55 – 16,69 Fase Luteínica: 1,38 – 5,47
17-Beta-Estradiol	101	pg/mL	Fase Folicular: 21 – 251 Meio do Ciclo: 30 – 649 Fase Luteínica: 21 – 312
Prolactina	32,96	ng/mL	5,18 – 26,53

Esta senhora apresenta uma TG elevada. Sendo que ainda não tem sintomatologia, o médico tem de fazer um controlo destes valores, podendo também fazer uma ecografia à tiroide, sob o risco de a senhora vir a desenvolver uma tiroidite autoimune (dado que tem os anticorpos elevados), como a tiroidite de Hashimoto. Apresenta também a prolactina elevada, o que sugere uma gravidez. Deve-se confirmar a hipótese de gravidez, efetuando um teste de gravidez e no caso de dar positivo, fazer-se um acompanhamento apertado aos valores de TG.

5.1.5 Vitaminas

Vitamina B12 é necessária para a formação dos eritrócitos, para o funcionamento do cérebro e dos nervos e para a produção de DNA ⁵⁰. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Vitamina B9, contribuindo para a divisão celular e produção de células em alguns órgãos e medula óssea. Tal como a vitamina B12, também ajuda a produzir energia no corpo ⁵¹. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

Vitamina D é necessária para o crescimento e desenvolvimento dos ossos. Ajuda também no crescimento celular e na função nervosa, muscular e imunitária ⁵². A amostra utilizada para este estudo é o soro.

5.1.6 Imunoglobulinas

IgG é uma imunoglobulina presente no sangue e produzida pelo sistema imunitário para combater bactérias, vírus e outros invasores que possam comprometer a saúde ⁵³. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

5.1.7 Proteínas

Ferritina é uma proteína que armazena ferro, sendo que os eritrócitos necessitam deste ferro para se formarem normalmente e para transportarem o oxigênio pelo corpo. Níveis baixos de ferritina são uma consequência da anemia por deficiência de ferro ⁵⁴. A amostra utilizada para este estudo é o soro.

5.2 VIDAS

O VIDAS é um aparelho que oferece testes de rotina para serologia e estudo da interação Ag-Ac. Cinco seções analíticas independentes permitem efetuar 30 testes em simultâneo ⁵⁵.

O princípio do ensaio é o Teste Imunoenzimático por Fluorescência (ELFA) que combina um método de imunoenensaio em sanduiche de duas fases com uma detecção final por fluorescência. O cone de utilização única serve como fase sólida e como dispositivo de pipetagem. Os reagentes para o ensaio estão prontos a utilizar e são pré-dispensados nas barretes seladas ⁵⁶.

Todos os passos do ensaio são efetuados automaticamente pelo aparelho. Após o passo de diluição da amostra, os Ags/Acs do agente a pesquisar são capturadas pelo Ag/Ac recombinante do agente que reveste o interior do cone. Os componentes não ligados são eliminados durante os passos de lavagem. Durante a segunda fase, as imunoglobulinas são especificamente detetadas por imunoglobulinas anti-humanas marcadas com fosfatase alcalina. Durante a fase final da detecção, o substrato é aspirado e expelido do cone. A enzima conjugada catalisa a hidrólise deste substrato num produto fluorescente, cuja fluorescência é medida em nanómetros. No final, os resultados são calculados automaticamente pelo instrumento de acordo com o padrão SI armazenado na memória e obtém-se um valor de teste ⁵⁶.

No LACUC os testes efetuados no VIDAS são IgM e IgG do Citomegalovírus, IgM e IgG da Rubéola, IgM e IgG do Toxoplasma, Hepatite B anticorpo anti-HBs, anticorpo anti-HBc total e antígeno HBs, Hepatite C anticorpo HCV e detecção de imunoglobulinas combinadas de anti-HIV1, anti-HIV2 e do antígeno p24 de HIV1 de HIV. A amostra utilizada para estes estudos é o soro.

Citomegalovírus é um vírus herpes beta com uma seroprevalência global de 60-90%. É a principal causa de infeções congénitas e representa um grande risco para a saúde de indivíduos imunocomprometidos. Embora a infeção por citomegalovírus seja tipicamente assintomática na população imunocompetente, a infeção pode resultar em mononucleose e

também tem sido associada ao desenvolvimento de certos cancros, bem como a doenças inflamatórias crónicas, como várias doenças cardiovasculares. Em doentes imunocomprometidos, incluindo doentes com SIDA, recetores de transplantes e fetos em desenvolvimento, a infeção por citomegalovírus está associada a um aumento das taxas de morbidade e mortalidade ⁵⁷. As imunoglobulinas pesquisadas no VIDAS são a IgM e a IgG no soro do utente. Neste tipo de infeção a IgM não pode ser usada sozinha para diagnosticar uma infeção primária uma vez que pode estar também presente durante a infeção secundária ⁵⁸.

Rubéola é uma doença causada por um vírus, sendo caracterizada por manchas vermelhas na pele. É contagiosa, transmitindo-se de pessoa a pessoa quando alguém infetado espirra, tosse ou fala, sendo uma doença mais prevalente na infância. Tem particular preocupação na gravidez dado que é transmissível ao feto (rubéola congénita) no qual pode provocar graves complicações ⁵⁹. A deteção de anticorpos IgM no soro do utente colhido nos primeiros dias de infeção, pode fornecer provas presuntivas de infeção atual ou recente. A prova laboratorial de imunidade baseia-se na deteção de IgG contra a rubéola ⁶⁰.

Toxoplasmose é uma infeção causada por um parasita denominado *Toxoplasma gondii*. Entre as pessoas infetadas, poucos têm sintomas dado que o sistema imunitário de uma pessoa saudável impede que o parasita cause doença. No entanto, em mulheres grávidas e pessoas imunocomprometidas, uma infeção por *Toxoplasma* pode causar graves problemas de saúde. O diagnóstico da toxoplasmose é feito normalmente por testes serológicos. Um teste que mede a IgG é usado para determinar se uma pessoa foi infetada. Se for necessário tentar estimar o tempo de infeção, o que é particularmente importante para as mulheres grávidas, também se utiliza um teste que mede a IgM ⁶¹.

Hepatite B é uma infeção do fígado causada pelo vírus da hepatite B. Algumas pessoas com hepatite B não necessitam de tratamento específico, sendo que o vírus acaba por ser eliminado pelo sistema imunitário no final de algumas semanas (infeção aguda) ⁶², mas para outras, a doença progride para uma doença grave e vitalícia conhecida como hepatite B crónica. É transmitida essencialmente por via sexual, podendo também ser transmitida por partilha de agulhas ou verticalmente durante a gestação ou nascimento ^{62,63}. Os testes VIDAS utilizados no LACUC fazem pesquisa serológica do anticorpo anti-HBs total, do anticorpo anti-HBc total e do antígeno HBs. A presença de anti-HBs é geralmente interpretada como um indicador de recuperação e imunidade da infeção pelo vírus da hepatite B. O anti-HBs também se desenvolve numa pessoa que foi vacinada com sucesso contra a hepatite B. Entre as pessoas que responderam à vacina os níveis de anti-HBs podem diminuir ao longo do tempo, no entanto, a maioria ainda está imune e cria uma resposta imunitária quando exposta ao vírus

da hepatite B. O anti-HBc total, mede tanto a IgM como IgG, surge no início dos sintomas da hepatite B aguda, e persiste durante toda a vida. A presença de anti-HBc total indica uma infeção anterior ou contínua com o vírus da hepatite B num período de tempo indefinido. As pessoas que têm imunidade à hepatite B através de uma vacina não desenvolvem anti-HBc. O antigénio HBs é uma proteína da superfície do vírus da hepatite B que pode ser detetada em níveis elevados no soro durante a infeção aguda ou crónica pelo vírus da hepatite B. A presença do AgHBs indica que a pessoa está infetada, exceto quando pode ser transitoriamente positivo nos 30 dias após uma dose da vacina contra a hepatite B. O organismo produz normalmente anticorpos contra o AgHBs como parte da resposta imunitária normal à infeção. O AgHBs é o antigénio utilizado na produção da vacina da hepatite B ⁶⁴.

Hepatite C é uma infeção do fígado causada pelo vírus da hepatite C, sendo transmitida através do contacto com sangue de uma pessoa infetada, comumente através da partilha de agulhas ou outro equipamento utilizado para preparar e injetar drogas. Para algumas pessoas, a hepatite C é uma doença de curta duração, mas para mais de metade das pessoas que são infetadas com este vírus, torna-se uma infeção crónica de longa duração. A hepatite C crónica pode resultar em problemas de saúde graves, ou mesmo fatais, como a cirrose e cancro do fígado. As pessoas com hepatite C crónica podem frequentemente não ter sintomas e não se sentir doentes. Quando os sintomas aparecem, são frequentemente um sinal de doença hepática avançada ⁶⁵. O estudo efetuado no LACUC é a pesquisa de anticorpos HCV (anti-HCV) no soro do utente. O teste de anti-HCV apenas fornece informação sobre a exposição passada ao vírus pois permite a deteção dos anticorpos IgG contra o vírus da Hepatite C. Um resultado negativo indica que o paciente nunca foi exposto ao vírus, por isso, o teste anti-HCV é usado apenas para excluir a infeção por HCV. Um resultado positivo indica uma infeção recente ou passada. Deve ser confirmado por PCR, detetando o genoma viral. Se o PCR detetar genoma temos uma infeção ativa crónica, se já não for detetado genoma estamos perante uma infeção passada ⁶⁶.

HIV também conhecido como vírus da imunodeficiência humana, é um vírus que ataca o sistema imunitário do organismo ⁶⁷. No VIDAS no LACUC, são testados os anticorpos anti-HIV1 e anti- HIV2 e o antigénio p24 de HIV em soro dos pacientes ⁶⁸. Se uma pessoa tem HIV, é produzido um antigénio chamado p24 antes de se desenvolverem os anticorpos. Um teste de antigénio/anticorpo realizado por um laboratório no soro pode normalmente detetar o HIV 18 a 45 dias após a exposição ⁶⁹.

5.2.1 Caso Clínico

Senhor de 25 anos vai ao médico com uma síndrome febril. O médico passa algumas análises que incluem hemograma (Tabela 3), exame morfológico do sangue periférico, reação de Paul-Bunnell e anticorpos anti-Epstein-Barr.

Tabela 3 - Análises do Caso Clínico

Análises	Resultados	Unidades	Valores de Referência
Eritrograma			
Eritrócitos	4,86	$\times 10^{12}/L$	4,31 – 5,90
Hemoglobina	14,8	g/dL	13,6 – 17,5
Hematócrito	45,2	%	41,0 – 51,0
Volume Globular Médio (VGM)	93,0	fL	80,0 – 97,0
Hemoglobina Globular Média (HGM)	30,3	Pg	26,0 – 34,0
Conc. Hemoglobina Globular média (CMHG)	32,6	g/dL	32,0 – 36,0
RDW(CV)	14,0	%	10,5 – 15,0
Leucograma			
Leucócitos	8,8	$\times 10^9/L$	4,0 – 10,0
Neutrófilos	30,9%	$2,7 \times 10^9/L$	2,0 – 8,0
Eosinófilos	0,3%	$0,0 \times 10^9/L$	0,0 – 0,5
Basófilos	0,3%	$0,0 \times 10^9/L$	0,0 – 0,3
Linfócitos	58,6%	$5,2 \times 10^9/L$	0,8 – 4,0
Monócitos	10,0%	$0,9 \times 10^9/L$	0,0 – 1,2
Plaquetograma			
Plaquetas	170	$\times 10^9/L$	140 - 440

Como se pode observar, o senhor tem uma inversão da fórmula leucocitária com predomínio de linfócitos em vez de neutrófilos. O exame morfológico do sangue periférico mostra alguns linfócitos ativados e alguns mononucleares atípicos. O exame morfológico é sugestivo de infecção por mononucleose infecciosa. Tanto o teste rápido como a serologia do vírus Epstein-Barr são efetuados no laboratório externo, pois são análises que não se efetuam no LACUC.

É feito um teste rápido que se baseia na reação de Paul-Bunnell sendo que o resultado obtido é positivo. O vírus Epstein-Barr infeta os linfócitos B que, subsequentemente, produzem um anticorpo heterófilo que é identificado através da sua reação com o antígeno Paul-Bunnell e é detetado por um método de aglutinação em látex. (122) De seguida é feita a serologia específica para o vírus Epstein-Barr através da pesquisa dos anticorpos derivados da apresentação do antígeno da cápside viral (VCA) tanto IgM como IgG. O anti-VCA IgM

aparece no início da infecção por EBV e, normalmente, desaparece no espaço de quatro a seis semanas. O anti-VCA IgG aparece na fase aguda da infecção por EBV, atinge um pico duas a quatro semanas após o início, diminui ligeiramente e depois persiste durante o resto da vida da pessoa ⁷⁰. Tanto o anti-VCA IgM como IgG são positivos. IgM >60,0 U/mL sendo que é positivo a partir de $\geq 20,0$ U/mL e IgG >47,80 U/mL, sendo que é positivo a partir de >40,0 U/mL. Posto isto, o senhor apresenta uma infecção primária pelo Vírus Epstein-Barr.

5.3 Técnicas Manuais

5.3.1 RPR

A sífilis é uma infecção multissistémica causada pela espiroqueta *Treponema pallidum* ⁷¹.

O teste rápido da reagina plasmática ou RPR é um teste não treponémico, apenas utilizado como rastreio. É um teste de floculação que deteta anticorpos produzidos pela infecção treponémica. Estes anticorpos, chamados reaginas, são produzidos aquando da invasão dos tecidos do hospedeiro. É utilizado o antígeno purificado de cardiolipina para detetar as reaginas presentes no soro do utente. O antígeno presente no teste está adsorvido à superfície de micropartículas de carvão para melhorar a diferença visual entre um resultado positivo e negativo. Todos os testes não treponémicos positivos devem ser confirmados por um teste treponémico sérico para eliminar falsos positivos. Os testes treponémicos pesquisam diretamente os anticorpos contra os antígenos treponémicos. A amostra utilizada é soro ⁷².

5.3.1.1 Caso Clínico

Senhor de 24 anos dirige-se ao laboratório no dia 18 de janeiro para fazer análises de rotina. O hemograma, as análises bioquímicas e as análises à urina não apresentam alterações. A nível da imunologia é pedido Antígeno HBs, Anticorpo HCV, Anticorpo HIV-1/HIV-2 e antígeno p24, sendo obtidos resultados negativos. Já a reação de RPR é reativa, tendo sido feitas as diluições e obtido um valor reativo na diluição até 1/16. Sendo que o RPR é um teste semi-quantitativo, são efetuadas diluições com o objetivo de fazer a quantificação até à diluição onde é detetada aglutinação.

O senhor regressa ao laboratório no dia 20 de janeiro, após ter ido ao médico, e apresenta uma prescrição para anticorpo anti-*Treponema pallidum* IgG, FTA-Abs que é um teste treponémico (teste confirmatório do RPR). Este teste é mandado para o laboratório externo e vem com um resultado positivo, confirmando assim a infecção por sífilis.

A 30 de março, com nova prescrição, é efetuada nova análise ao Anticorpo HBs, Anticorpo HIV-1/HIV-2 e antígeno p24 que continuam negativos e RPR que se mantém reativo com um título de 1/16.

Regressa a 17 de maio onde faz novamente análises ao Anticorpo HBs que continua negativo e à RPR que apesar de reativo, apresenta um título de 1/1, o título está a diminuir o que indica que o tratamento está a ser eficaz.

5.3.2 Tipagem sanguínea

A tipagem sanguínea é efetuada através dos anticorpos e antígenos presentes no sangue. O sistema utilizado é o sistema AB0 que classifica 4 grupos sanguíneos distintos. O grupo A tem antígeno A à superfície dos eritrócitos, com anticorpos anti-B no plasma. O grupo B tem antígeno B à superfície dos eritrócitos com anticorpos anti-A no plasma. O grupo 0 não tem antígenos A ou B na superfície dos eritrócitos, mas tem anticorpos anti-A e anti-B no plasma. O grupo AB tem antígeno A e B, mas não tem anticorpos no plasma ^{73,74}.

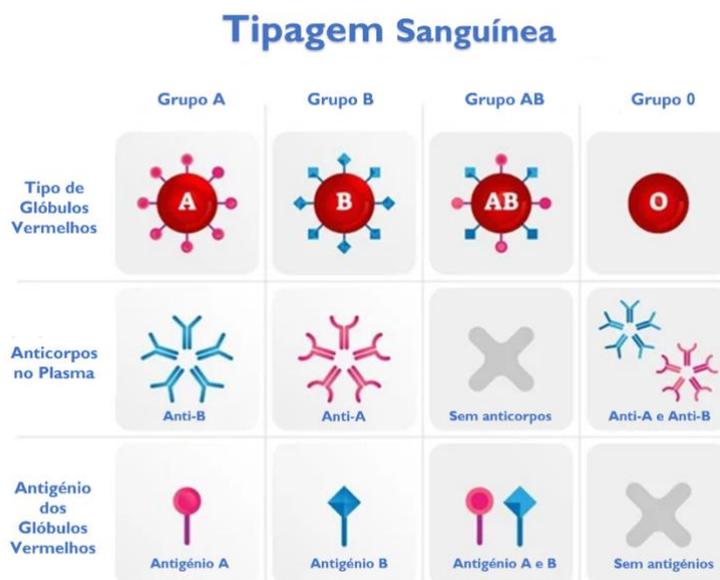


Figura 11 - Tipagem sanguínea ⁷⁵. Imagem adaptada.

Os eritrócitos têm ainda outro antígeno, uma proteína conhecida como o antígeno Rh. Se estiver presente este antígeno, o grupo sanguíneo é Rh positivo, se estiver ausente é Rh negativo.

A tipagem é efetuada misturando os eritrócitos do sangue em estudo com diferentes soluções de anticorpos. Se, por exemplo, a solução tiver anticorpos anti-B e houver antígenos B nas células (o grupo sanguíneo for B), vai haver aglutinação ^{73,74}.

5.3.3 Teste de Coombs Indireto

O teste de Coombs Indireto, também denominado teste indireto de anti-globulina humana, avalia a presença de anticorpos no plasma/soro contra antígenos dos eritrócitos. É utilizado como teste de incompatibilidade feto-materna (Rh) para pesquisa de anticorpos anti-D livres no soro. Para este teste podemos usar um reagente específico ou fazer uma *pool* de eritrócitos 0Rh⁺. O objetivo é ver se há aglutinação ou não entre os eritrócitos 0Rh⁺ e os anticorpos no plasma ou soro do doente. Se o resultado for negativo há ausência de aglutinação, e se for positivo há aglutinação. Uma pessoa Rh positivo apresenta antígeno anti-D à superfície dos eritrócitos pelo que não possui anticorpos anti-D no soro e, portanto, terá obrigatoriamente um Coombs indireto negativo. Informação baseada no protocolo específico do laboratório.

5.3.4 Teste de gravidez

Os testes de gravidez fazem a pesquisa da hormona Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG) na urina ⁷⁶.

O teste de gravidez efetuado no LACUC é um imunoensaio cromatográfico rápido para a deteção qualitativa da HCG na urina e conseqüentemente a deteção da gravidez numa fase inicial dado que durante a gravidez os níveis de HCG aumentam. O teste utiliza duas linhas para indicar os resultados, uma linha de teste que contém uma combinação de anticorpos, incluindo um anticorpo monoclonal anti-HCG, detetando os níveis elevados de HCG. Contém também uma linha controlo composta por anticorpos policlonais de cabra e partículas de ouro coloidal. O ensaio é realizado adicionando uma amostra de urina e obtendo como resultado uma ou duas linhas coloridas. A amostra migra por ação capilar ao longo da cassette e reage com o conjugado colorido. As amostras positivas reagem com o conjugado colorido do anticorpo HCG específico formando a linha colorida na zona de teste. A ausência desta linha sugere um resultado negativo. Como controlo, temos uma linha colorida na região controlo que nos mostra que o teste é válido ⁷⁷.

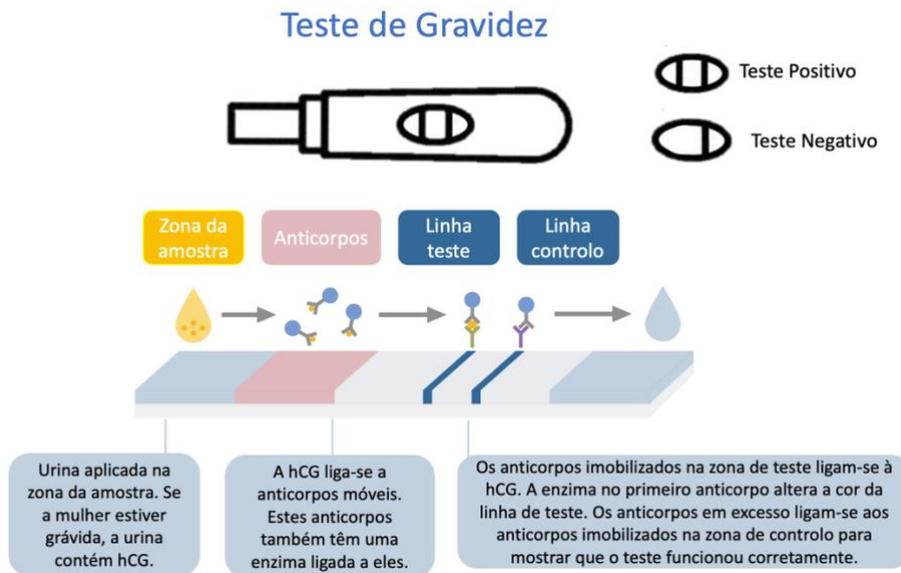


Figura 12 - Teste de gravidez⁷⁶. Imagem adaptada.

5.3.5 Pesquisa de sangue oculto nas fezes

O teste de cassete de um passo é um teste imunocromatográfico rápido e fácil para determinar qualitativamente o sangue fecal. A tira de membrana teste tem duas linhas, a linha teste e a linha controlo. A linha controlo serve meramente para controlar o procedimento, devendo aparecer sempre que o procedimento do teste seja efetuado corretamente e os reagentes de teste da linha estejam funcionais. Se existir hemoglobina suficiente na amostra, será visível uma linha de teste roxa. Se não existir hemoglobina na amostra, não será apresentada cor na linha de teste ⁷⁸.

Após a colheita e preparação da amostra, é adicionada uma amostra extraída à cassete. A hemoglobina na amostra extraída reage com os conjugados de ouro coloidal anti-hemoglobina humana presentes no bloco de teste formando um complexo de hemoglobina e conjugados de ouro coloidal. À medida que a mistura migra por capilaridade, ao longo da cassete, o complexo é capturado por outra anti-hemoglobina humana imobilizada na linha de teste e produz uma linha colorida ⁷⁸.

5.3.6 Teste Rápido de COVID-19

Os testes rápidos de antígeno são imunoenaios que requerem amostras respiratórias (normalmente zaragatoa nasofaríngea ou nasal) do doente, uma vez que o SARS-CoV-2 é um vírus respiratório. Uma vez colhidas, as amostras são colocadas num tampão de extração ou reagente e testadas quanto à presença de antígenos específicos do SARS-CoV-2 ⁷⁹.

Os testes rápidos de antígeno indicam se um doente está ativamente infectado com o SARS-CoV-2. Detetam os antígenos da proteína da Nucleocápside (N) do SARS-CoV-2. Os resultados são produzidos rapidamente, geralmente em 15 minutos e se o antígeno viral for detetado, isso indica que o vírus está presente ⁷⁹.

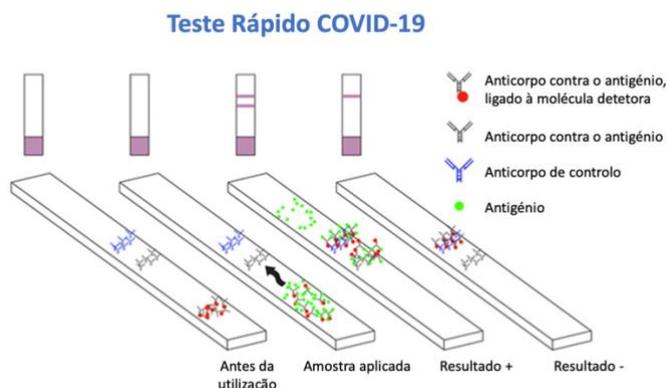


Figura 13 - Teste rápido de COVID-19 ⁸⁰. Imagem adaptada.

6. Microbiologia

Segundo a sociedade de microbiologia, esta é o estudo de todos os organismos vivos que são demasiado pequenos para serem visíveis a olho nu. Isto inclui, entre outros, bactérias, alguns parasitas, vírus, fungos e leveduras ⁸¹.

Na Microbiologia são analisadas diversas amostras, tendo sido acompanhadas amostras de urina, fezes, exsudados vaginais, nasais, faríngeos e orofaríngeos.

O tipo de amostra analisada mais frequentemente no LACUC é a amostra de urina, onde são feitas análises de sumária de urina ou também uroculturas.

A nível das amostras de fezes pode-se fazer coproculturas ou pesquisa de parasitas nas fezes. Na coprocultura é feita a pesquisa de *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* nos meios de cultura adequados. Na pesquisa de parasitas nas fezes, são necessárias três amostras sendo feito inicialmente um exame a fresco, depois a concentração de ovos/parasitas fecais e de seguida o concentrado é colocado entre lâmina e lamela e observado ao microscópio. O exame parasitológico de fezes visa a identificação de ovos, larvas ou seres adultos de helmintas, quistos ou trofozoítos de protozoários e/ou vermes. A técnica efetuada tem o objetivo de aumentar o número de quistos, trofozoítos, ovos ou larvas na preparação, eliminar a maior parte dos resíduos fecais e apresentar os organismos num estado inalterado, de forma a serem facilmente identificados ⁸².

A nível dos exsudatos uretrais e vaginais inicia-se por se fazer uma coloração de Gram. A nível dos exsudatos nasais, faríngeos e orofaríngeos não se efetuam coloração de Gram. De seguida são feitas culturas nos meios mais adequados. Se houver crescimento nos meios é feito um API e um antibiograma. O API serve para saber qual a bactéria que está a causar a infeção e o antibiograma serve para ver as resistências dessa bactéria a antibióticos.

A deteção de *Streptococcus* do Grupo A (Strep A) é feita através de um teste rápido para a deteção qualitativa e presuntiva dos antígenos deste grupo de bactérias a partir de espécimes orofaríngeas. Neste teste, os anticorpos específicos para antígenos de Strep A são imobilizados na área da linha de teste. Durante o teste, os antígenos extraídos das amostras de esfregaços são capturados pelos anticorpos específicos para Strep A, que estão agregados às partículas. A mistura migra ao longo da membrana e o complexo antígeno-anticorpo-partícula liga-se ao anticorpo específico da área da linha de teste. A aglomeração dos complexos cria uma linha colorida na área da linha de teste. Esta linha colorida indica um resultado positivo, enquanto a sua ausência indica um resultado negativo. Uma linha vermelha deve aparecer sempre na área da linha de controlo, servindo de controlo processual e indicando que o teste correu corretamente e que o resultado é válido ⁸³.

Todas as amostras são tratadas de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais, em condições de assepsia sempre que necessário.

7. Hematologia

Hematologia é o estudo do sangue e das doenças do sangue ⁸⁴. Os estudos de hematologia efetuados no LACUC são o hemograma em que se usa o aparelho DXH500, o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativado efetuados no aparelho Yumizen G400 e a velocidade de sedimentação. Quando os valores do hemograma surgem alterados, ou quando o clínico solicita, são feitos esfregaços de sangue periférico e consoante a situação é feita a coloração e contagem de reticulócitos ou a coloração de May Grunwald-Giemsa.

As amostras utilizadas na área de hematologia são o sangue total que consiste na colheita de sangue para um tubo com EDTA e o plasma que consiste na colheita do sangue para um tubo com citrato.

O DXH 500 é um aparelho que permite uma análise celular eficaz, incorporando o Princípio de Coulter e medições óticas em citometria de fluxo ⁸⁵. O Princípio de Coulter baseia-se no facto de quando uma partícula passa através de uma abertura, ela cria resistência. Quanto maior o tamanho da partícula, maior a resistência criada e, por conseguinte, maior a

voltagem. Cada pico de tensão é diretamente proporcional ao tamanho da célula. Através deste princípio, o aparelho consegue fazer a distinção das diversas células sanguíneas devido aos seus diferentes tamanhos ⁸⁶. O hemograma vem dividido em eritograma, leucograma e plaquetograma e, quando os valores surgem alterados o LACUC utiliza técnicas manuais para se avaliar a situação. Uma das técnicas manuais utilizadas é a contagem dos reticulócitos, em que é medido o número de glóbulos vermelhos imaturos ⁸⁷. Para efetuar esta contagem os reticulócitos necessitam de ser corados para serem visíveis e distinguíveis ao microscópio para posteriormente serem contados. Por outro lado, quando se quer estudar a morfologia celular é feito um esfregaço sanguíneo e posteriormente uma coloração de May Grunwald-Giemsa ⁸⁸. A amostra utilizada é o sangue total.

O Yumizen G400 é um aparelho de coagulação semi-automatizado utilizado no LACUC para efetuar o tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT). As medições são efetuadas por coagulometria ⁸⁹ que é a medição da coagulação do sangue ⁹⁰.

PT mede o tempo necessário para gerar fibrina após a activação do factor VII. É um teste de rastreio para as vias extrínsecas e comuns da coagulação. O APTT mede o tempo necessário para gerar fibrina a partir do início da via intrínseca. É um teste de rastreio para as vias intrínseca e comum da coagulação ⁹¹. A amostra utilizada é o plasma.

A velocidade de sedimentação é uma análise ao sangue total que mede a rapidez com que os eritrócitos se separam do plasma. Durante esta análise, uma pequena quantidade de sangue é colocada num tubo vertical. Um especialista do laboratório medirá a velocidade a que os eritrócitos se depositam no fundo do tubo após 1 hora. Se o utente tem uma doença que causa inflamação ou dano celular, os glóbulos vermelhos tendem a aglomerar-se. Isto torna-os mais pesados, pelo que assentam mais depressa. Quanto mais depressa os glóbulos vermelhos se depositam e caem, maior é a velocidade de sedimentação sendo que se estiver elevada indica ao profissional de saúde que pode haver um processo inflamatório ⁹².

8. Bioquímica

As análises bioquímicas efetuadas no LACUC são todas feitas no aparelho Architect c4000. A amostra mais utilizada para as determinações é o soro, sendo também utilizado o sangue total obtido com EDTA para a determinação da hemoglobina glicada e a urina para medir os níveis de creatinina na urina e a albumina de baixa concentração na urina. Os diferentes parâmetros determinados encontram-se referidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros Bioquímicos

Grupo	Parâmetros
Enzimas	Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Gama-Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase Alcalina (FA), Creatinina Cinase Total (CK), Lactato Desidrogenase (LDH), Amilase, Lipase.
Iões	Cloreto, Sódio, Potássio, Cálcio, Magnésio, Fosfato, Ferro.
Proteínas	Albumina, Lipoproteína de alta densidade (HDL), Transferrina, Ferritina, Albumina de baixa concentração na urina.
Metabolitos	Lactato, Bilirrubina (Total e Direta), Triglicerídeos, Colesterol, Ácido Úrico, Creatinina, Proteínas Totais, Ureia, Creatinina na Urina.
Outros Marcadores Bioquímicos	Hemoglobina Glicada (HbA1c), Glicose, Proteína C Reativa (CRP).

Estes ensaios são baseados em métodos espectrofotométricos, sendo que os iões são determinados através da condutividade ⁹³. A espectrofotometria é a medição quantitativa da interação da radiação ultravioleta (UV), visível ou infravermelha (IV) com um material ⁹⁴. A nível dos iões, a sua determinação baseia-se na sua capacidade de conduzir a corrente elétrica, onde a corrente é proporcional à sua concentração no soro ⁹⁵.

9. Outras atividades desenvolvidas

Além das análises clínicas, o LACUC tem como uma das suas maiores valências o desenvolvimento de investigação. Perante este cenário, foi dada a possibilidade às alunas estagiárias de participarem na publicação de um Poster que foi apresentado no Congresso Nacional de Virologia – Pandemias na Era da Globalização, com o título “COVID-19 em Portugal: Efeito da vacinação na casuística de um laboratório da região centro”, disposto na Figura 14.

P13 | COVID-19 em Portugal: Efeito da vacinação na casuística de um laboratório da região centro

Autor Apresentador: Ana Miguel Matos

Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), Portugal; Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF), Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal.

Outros Autores: Daniela Veiga¹; Joana Oliveira²; Ana Rodrigues¹; Daniela Saldanha¹; Ana Miguel Matos^{1,2}.

1 Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), Portugal; 2 Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF), Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal.

Introdução: Em Portugal, os primeiros casos de COVID-19 foram confirmados a 2 de março de 2020. De forma a prevenir e controlar este grave problema de saúde pública, várias medidas higiénico-sanitárias foram implementadas, incluindo a testagem de todos os casos suspeitos e contactos de casos positivos. O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) assumiu um papel preponderante nesta missiva, assegurando o reforço da testagem na Região Centro de Portugal. A 27 de dezembro de 2020, Portugal deu início ao plano de vacinação contra a COVID-19, outra medida fulcral no controlo da pandemia.

Objetivo: Retratar o efeito do plano de vacinação na evolução da pandemia de COVID-19, através da casuística de um Laboratório da Região Centro de Portugal.

Metodologia: Análise dos resultados de RT-PCR obtidos para pesquisa de SARS-CoV-2 no LACUC, durante um período de dois anos: abril de 2020 a março de 2022. O período de tempo foi selecionado por forma a abranger os principais picos pandémicos. Os dados disponíveis foram agrupados por trimestre, e em função da idade dos utentes, tendo esta sido categorizada em <18, 18-24, 25-49, 50-64, 65-79 e ≥80.

Resultados: No período selecionado foram analisadas 144 911 amostras, com uma percentagem de positividade de 10%. Os valores mais elevados de positividade ocorreram durante o primeiro trimestre de 2021 e de 2022. Os elevados valores no primeiro trimestre de 2022 coincidem com o período em que os testes de RT-PCR passaram a ser maioritariamente utilizados para confirmar testes rápidos de antígeno positivos.

Adultos com idade ≥80 anos representaram o grupo etário com maior percentagem de casos positivos até ao 1º trimestre de 2021, altura em que teve início a vacinação deste grupo populacional. No 3º trimestre de 2021 voltou a ser este o grupo populacional com maior percentagem de casos positivos, tendência que foi revertida após reforço da vacinação.

Conclusão: Os dados obtidos confirmam que o número de casos de COVID-19 em Portugal, variaram em função do plano de vacinação e da variação temporal da proteção conferida pelas várias doses da vacina, enfatizando a importância da adesão aos programas de vacinação.

E-mail: anamatos@ci.uc.pt

Figura 14 - Imagem do Poster retirada do livro de resumos do Congresso

10. Conclusão

O estágio referente ao Mestrado em Análises Clínicas, foi uma fase que teve um período de 6 meses, no qual foram abordadas diversas áreas da clínica, como a imunologia, a microbiologia, a hematologia, a biologia molecular e a bioquímica.

Este processo conteve diversos momentos de maior ou menor dificuldade, os quais estão diretamente relacionados, quer com a formação acadêmica prévia, quer com as características intrínsecas do LACUC. A oportunidade de realizar este tipo de estágio nestas condições e neste ambiente laboratorial, proporcionam um *know-how* essencial para completar a formação em Análises Clínicas.

Durante este mesmo período, houve diversas dificuldades e/ou limitações associadas ao estágio propriamente dito, as quais estavam dependentes do número e variedade de amostras, assim como as diversas calibrações e controlos associados à aparelhagem laboratorial utilizada.

O modelo no qual está baseado este tipo de estágio, teve por base uma liberdade de trabalho que incute uma responsabilidade aos diversos intervenientes, em especial aos alunos, sempre acompanhada e mediada pelos responsáveis do laboratório. Estas condições permitiram o desenvolvimento de novas competências que inevitavelmente culminaram na aquisição de novos conhecimentos e confiança na elaboração das tarefas atribuídas.

Identifica-se como uma lacuna neste estágio, a necessidade de uma maior e mais diversa lista de amostras, como uma complementaridade de exemplos quer de patologias, testes e casos tendencialmente raros. A verificação e discussão dos resultados obtidos dos diversos testes realizados acaba por também não ser incluída numa discussão que possibilite a associação entre o caso teórico e o caso clínico.

O Mestrado em Análises Clínicas prepara os alunos para o mundo do trabalho num laboratório de análises clínicas. Durante o primeiro ano e metade do segundo, os alunos têm aulas onde lhes são ensinadas as mais diversas valências que existem no laboratório e nos últimos seis meses do segundo ano, os alunos fazem um estágio num laboratório.

O estágio é uma parte essencial deste mestrado, pois é aí que os alunos convivem com a realidade do trabalho no laboratório e aplicam todos os conhecimentos aprendidos ao longo do mestrado. Durante o estágio é incutido um nível elevado de responsabilidade, pois todo o trabalho efetuado é minucioso e um pequeno erro pode levar a resultados adulterados. O estágio é assim uma mais-valia que enriquece o mestrado e os alunos que dele fazem parte.

Bibliografia

1. Spinner, N. B. & Ferguson-Smith, M. A. Cytogenetic analysis. in *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics: Clinical Principles and Applications* (2018). doi:10.1016/B978-0-12-812536-6.00005-5.
2. Amalia Dutra. Cytogenetics. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cytogenetics> (2023).
3. Wieacker, P. & Steinhard, J. The prenatal diagnosis of genetic diseases. *Dtsch Arztebl Int* **107**, (2010).
4. Ozkan, E. & Lacerda, M. P. *Genetics, Cytogenetic Testing And Conventional Karyotype*. StatPearls (2021).
5. Rolnik, D. L., Wertaschnigg, D., Benoit, B. & Meagher, S. Sonographic detection of fetal abnormalities before 11 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* vol. 55 Preprint at <https://doi.org/10.1002/uog.21921> (2020).
6. Stela Z. Berisha, Shashi Shetty, Shashi Shetty & Anna L. Mitchell. Cytogenetic and molecular diagnostic testing associated with prenatal and postnatal birth defects. *Birth Defects Res* **293–306** (2020) doi:10.1002/bdr2.1648.
7. Laboratório de Citogenética e Genómica (LCG-FMUC). Cariótipo de bandas de alta resolução. <https://www.uc.pt/portaluclab/plataformas/laboratorio-de-citogenetica-e-genomica-lcg-fmuc/servicos/cariotipo-de-bandas-de-alta-resolucao/> (2023).
8. Gersen, S. L. & Keagle, M. B. *The principles of clinical cytogenetics, third edition*. *The Principles of Clinical Cytogenetics, Third Edition* (2013). doi:10.1007/978-1-4419-1688-4.
9. Inês Catarina Garcia Ribeiro. Hemato-oncologia: Contributo da citogenética convencional e molecular no centro hospitalar de Trás-os-Montes e alto Douro (CHTMAD). (Universidade de Coimbra, 2022).
10. Thermo Fisher Scientific. Gibco™ AmnioMAX™-II Complete Medium. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11269016?ef_id=Cj0KCCQjwpPKiBhDvARIsACn-gzDzlvoczHgBRlHwrMz4ZvUIXHBkcg_DrfXmShNLqeHzaVljqXAHnMaAqzTEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!605589671969!!!g!!!382790548!127140246227&cid=bid_clb_cce_r0l_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&gclid=Cj0KCCQjwpPKiBhDvARIsACn-gzDzlvoczHgBRlH-wrMz4ZvUIXHBkcg_DrfXmShNLqeHzaVljqXAHnMaAqzTEALw_wcB (2023).

11. Ana Teresa Mousinho Resina Ribeiro. Abordagens Citogenéticas e Citogenómicas no Diagnóstico Pré-Natal e Pós-Natal. (Universidade de Coimbra, 2022).
12. Bates, S. E. Classical Cytogenetics: Karyotyping Techniques BT - Human Pluripotent Stem Cells: Methods and Protocols. in *Human Pluripotent Stem Cells. Methods in Molecular Biology* (2011).
13. Thermo Fisher Scientific. Gibco™ KaryoMAX™ Colcemid™ Solution in PBS. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15212012> (2023).
14. Merck. Trypsin from bovine pancreas. https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/t8658?gclid=Cj0KCCQjwu-KiBhCsARIsAPztUF0e-K_teK9KfZgOLfnKI5wv_fv9tF8gBjy9FGUcNNDIreN9d-gTZTEaAj96EALw_wcB&gclidsrc=aw.ds (2023).
15. José Carlos Lima do Seixo. Laboratório de Citogenética. (Universidade do Porto, 2018).
16. Thermotron. CDS-5 – Cytogenetic Drying Chamber. <https://thermotron.com/equipment/specialty-environmental-chamber/cds-5-cytogenetic-drying-chamber/> (2023).
17. Huang, H. & Chen, J. Chromosome bandings. *Methods in Molecular Biology* **1541**, (2017).
18. Ros Hastings, Rod Howell, Franca Dagna Bricarelli, Ulf Kristoffersson & Simona Cavani. *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics*. https://www.e-c-a.eu/files/downloads/guidelines/e.c.a._general_guidelines_version-2.0.pdf (2012).
19. Ozkan, E. & Lacerda, M. P. *Genetics, Cytogenetic Testing And Conventional Karyotype*. *StatPearls* (2021).
20. Stevens-Kroef, M., Simons, A., Rack, K. & Hastings, R. J. Cytogenetic nomenclature and reporting. *Methods in Molecular Biology* **1541**, (2017).
21. De Domenico, R. *et al.* Increased nuchal traslucency in normal karyotype fetuses. *J Prenat Med* **5**, (2011).
22. Maloy, S. & Hughes, K. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (2013).
23. Gardner, R. J. M. & Amor, D. J. *Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. *Clinical Medicine* vol. 1 (2018).
24. Cereda, A. & Carey, J. C. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-81> (2012).

25. Kepple, J. W., Fishler, K. P. & Peeples, E. S. Surveillance guidelines for children with trisomy 18. *American Journal of Medical Genetics, Part A* vol. 185 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62097> (2021).
26. Ordem dos Farmacêuticos. *Normas para o Laboratório Clínico*. (2016).
27. World Health Organization. *Laboratory quality management system: handbook*. (2011).
28. Kinns, H., Pitkin, S., Housley, D. & Freedman, D. B. Internal quality control: Best practice. *Journal of Clinical Pathology* vol. 66 Preprint at <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201661> (2013).
29. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Guia RELACRE 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos. (1996).
30. Filipa da Costa Vilhena. Controlo de qualidade em laboratório clínico: hemoglobinopatias. (Instituto Superior Egas Moniz, 2015).
31. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Avaliação Externa da Qualidade. <https://www.insa.min-saude.pt/category/servicos/avaliacao-externa-da-qualidade/> (2023).
32. Cleveland Clinic. Immune System. <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/21196-immune-system> (2020).
33. Abbott. ARCHITECT. <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/architect.html> (2023).
34. Lydia Marchã Portela. Relatório de estágio: mestrado em análises clínicas. (Universidade de Coimbra, 2016).
35. Cinquanta, L., Fontana, D. E. & Bizzaro, N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights* **8**, (2017).
36. Wild, D. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques* (2013).
37. National Cancer Institute. Tumor Markers in Common Use. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-list> (2021).
38. Instituto da Próstata. Exame do PSA. <https://www.institutodaprostata.com/pt/analises-e-exames/exame-do-psa> (2023).
39. Cleveland Clinic. Thyroid Hormone. <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/22391-thyroid-hormone> (2023).

40. University of Rochester Medical Center. Free and Bound Triiodothyronine (Blood). https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=167&ContentID=t3_free_and_bound_blood (2023).
41. Mayo Clinic. Thyroid peroxidase antibody test: What is it? <https://www.mayoclinic.org/thyroid-disease/expert-answers/faq-20058114> (2023).
42. British Thyroid Foundation. Thyroid antibodies explained. <https://www.btf-thyroid.org/thyroid-antibodies-explained> (2023).
43. Lynne Burek, C., Rose, N. R. & Caturegli, P. Thyroglobulin, thyroperoxidase, and thyrotropin-receptor autoantibodies. in *Autoantibodies* (2007). doi:10.1016/B978-044452763-9/50055-X.
44. University of Rochester Medical Center. Estradiol (Blood). <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=167&ContentID=estradiol> (2023).
45. University of Rochester Medical Center. Follicle-Stimulating Hormone. https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=167&contentid=follicle_stimulating_hormone (2023).
46. University of Rochester Medical Center. Luteinizing Hormone (Blood). https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=167&ContentID=luteinizing_hormone_blood (2023).
47. University of Rochester Medical Center. Total Testosterone. https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=167&contentid=testosterone_total (2023).
48. University of Rochester Medical Center. Progesterone. <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=167&ContentID=progesterone> (2023).
49. National Cancer Institute. Tumor Markers in Common Use. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-list> (2021).
50. University of Rochester Medical Center. Vitamin B-12. <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=19&contentid=vitaminb-12> (2023).
51. University of Rochester Medical Center. Folic Acid. <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=19&contentid=vitaminb-9> (2023).

52. University of Rochester Medical Center. Vitamin D. <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=19&contentid=vitamind> (2023).
53. University of Rochester Medical Center. Quantitative Immunoglobulins. https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contentid=quantitative_immunoglobulins&contenttypeid=167 (2023).
54. University of Rochester Medical Center. Ferritin (Blood). https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=167&contentid=ferritin_blood (2023).
55. Biomérieux. VIDAS® 30. (2023).
56. Biomérieux. VIDAS® SARS-COV-2 IgG. Preprint at <https://www.fda.gov/media/140937/download> (2021).
57. Fulkerson, H. L., Nogalski, M. T., Collins-McMillen, D. & Yurochko, A. D. Overview of Human Cytomegalovirus Pathogenesis. in *Methods in Molecular Biology* vol. 2244 (2021).
58. Centers for Disease Control and Prevention. Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. <https://www.cdc.gov/cmvc/clinical/lab-tests.html> (2020).
59. SNS24. Doenças Infecciosas: Rubéola. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/rubeola/#> (2023).
60. Centers for Disease Control and Prevention. Measles (Rubeola). <https://www.cdc.gov/measles/lab-tools/serology.html> (2022).
61. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Toxoplasmosis (Toxoplasma infection). <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/> (2023).
62. SNS24. Vírus da hepatite B (VHB). (2023).
63. Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hepatitis B: Frequently Asked Questions for the Public. <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/bfaq.htm#bFAQa03> (2023).
64. Centers for Disease Control and Prevention. Interpretation of Hepatitis B Serologic Test Results. (2023).
65. Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hepatitis C. <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/index.htm> (2023).
66. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis C: Questions and Answers for Health Professionals. <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm#c3> (2020).

67. Centers for Disease Control and Prevention. About HIV. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html> (2022).
68. Centers for Disease Control and Prevention. HIV: Types of Tests. (2022).
69. Centers for Disease Control and Prevention. HIV Testing. <https://www.cdc.gov/hiv/testing/index.html> (2022).
70. Centers for Disease Control and Prevention. Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. <https://www.cdc.gov/epstein-barr/laboratory-testing.html> (2020).
71. Satyaputra, F., Hendry, S., Braddick, M., Sivabalan, P. & Norton, R. The Laboratory Diagnosis of Syphilis. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 59 Preprint at <https://doi.org/10.1128/JCM.00100-21> (2021).
72. Feske, S. K. Laboratory Evaluation. in *Office Practice of Neurology* (2003). doi:10.1016/B0-44-306557-8/50020-4.
73. National Health System. Blood groups. <https://www.nhs.uk/conditions/blood-groups/> (2023).
74. Adnan Mujahid & Franz L Dickert. Blood Group Typing: From Classical Strategies to the Application of Synthetic Antibodies Generated by Molecular Imprinting. *Sensors* (2015) doi:10.3390/s16010051.
75. Nutri Advanced. Blood Types - Our Constitutional Biological Imprint. <https://www.nutriadvanced.co.uk/news/blood-types-our-constitutional-biological-imprint/> (2023).
76. Cleveland Clinic. Pregnancy Tests. <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/9703-pregnancy-tests> (2022).
77. Abbot. SureStep® hCG. Preprint at <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjzqoXB3YeAAxVrWaQEHTcJBeYQFnoECBIQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.sssaustralia.com.au%2FDocumentDownload.aspx%3FS%3DDDT1bh5dPz%252BKNZpeGNbbC0%252BUEaNoeHuSOiVQuw6bF0u3geztdMKEhiMiW6%252F5nH1yJTazoMeAkHT2p1hr7jY7%252BMNYg6hvndDFdYgqCcelxEPqddSt5hdfUz%252BacPltYQBfO49iVloWI5P%252FtB65axkOOqjq2XVrUoxGx&usg=AOvVaw3kNrKUxIJHftTy4TaeTstn&opi=89978449> (2019).
78. PANTEST. SD-Fob. Preprint at https://irp.cdn-website.com/849c79f0/files/uploaded/Folheto%20Informativo_FOB_.pdf (2021).

79. American Society for Microbiology. COVID-19 Testing FAQs. <https://asm.org/Articles/2020/April/COVID-19-Testing-FAQs> (2020).
80. American Society for Microbiology. COVID-19 Testing FAQs. <https://asm.org/Articles/2020/April/COVID-19-Testing-FAQs> (2020).
81. Microbiology Society. What is Microbiology? <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology.html> (2023).
82. Epitope Diagnostics, I. Fecal Ova/Parasite Concentration Kit (FPC200). (2023).
83. Biosynex. BIOSYNEX Strep A. Preprint at https://rhogen.es/wp-content/uploads/2020/11/IFU_1030005_EN_V01201602R01.pdf (2022).
84. Johns Hopkins Medicine. Hematology. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/treatment-tests-and-therapies/hematology> (2023).
85. Beckman Coulter. DxH 500 Hematology Analyzer. <https://www.beckmancoulter.com/en/products/hematology/dxh-500#/specifications> (2023).
86. Beckman Coulter. O Princípio de Coulter. <https://www.beckman.pt/resources/technologies/flow-cytometry/history/coulter-principle> (2023).
87. Cleveland Clinic. Reticulocyte Count. <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/22787-reticulocyte-count> (2022).
88. Laboratory Tests. May Grunwald-Giemsa Stain: Principle, Preparation and Procedure. <https://laboratorytests.org/may-grunwald-giemsa-stain-principle-preparation-and-procedure/> (2022).
89. Horiba Medical. Yumizen G400. <https://www.horiba.com/bra/medical/products/detail/action/show/Product/yumizen-g400-472/> (2023).
90. Horiba Medical. Clotting method. <https://www.horiba.com/sgp/medical/academy/technology/clotting-method> (2023).
91. Horiba Medical. Hemostasis Guide: Screening Tests. <https://www.horiba.com/deu/medical/academy/hemostasis-guide/screening-tests/> (2023).
92. University of Rochester Medical Center. Erythrocyte Sedimentation Rate. https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=167&contentid=erythrocyte_sedimentation_rate (2023).
93. Abbot. ARCHITECT ci4100. <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/architect/architect-ci4100.html> (2023).

94. Thomas A. Germer, Joanne C. Zwinkels & Benjamin K. Tsai. Introduction. in *Experimental Methods in the Physical Sciences* (2014). doi:10.1016/B978-0-12-386022-4.00001-7.
95. Ana Isabel Mendes Frias. Relatório de estágio: mestrado em análises clínicas. (Universidade de Coimbra, 2016).