



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Patrícia Alfaia Nunes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Professor Doutor Stefano Girotti, pela Doutora Marta Prata, pela Professora Doutora Maria José Rego de Sousa e pela Professora Doutora Ana Miguel Matos Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

Ana Patrícia Alfaia Nunes



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pelo Professor Doutor Stefano Girotti, pela Doutora Marta Prata,
pela Professora Doutora Maria José Rego de Sousa
e pela Professora Doutora Ana Miguel Matos Silva,
e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

setembro 2019

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais e às minhas irmãs por me terem dado as ferramentas necessárias para partir nesta aventura, pelo suporte emocional e incentivo constante.

À Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa e à Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva, que foram incansáveis na procura de um melhor estágio possível. Agradeço ainda, à Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva, que na qualidade de orientadora interna se demonstrou sempre disponível para me orientar e rever este relatório de forma crítica.

Ao Professor Doutor Stefano Girotti, à Doutora Marta Prata e à Professora Doutora Maria José Rego de Sousa, que na qualidade de orientadores externos estiveram sempre disponíveis para esclarecer as minhas dúvidas e que mesmo com todas as adversidades, me proporcionaram um estágio de máxima qualidade.

A todos os laboratórios, setores e equipas de trabalho por onde passei, agradeço a orientação, a dedicação e o interesse manifestado.

Agradeço à Universidade de Coimbra, universidade mais antiga de Portugal que me permitiu estudar na Università di Bologna, a universidade mais antiga da Europa. Agradeço a ambas, por me terem proporcionado umas das melhores experiências da minha vida e por me mostrarem que o mundo é, de facto, um lugar sem fronteiras.

Por último, aos meus amigos de Bologna que fizeram desta experiência o melhor que eu alguma vez podia ter imaginado.

“L'osservazione al microscopio rivelerà cose più meravigliose di quelle viste in termini di mera struttura e connessione (...)”

“Observation by means of the microscope will reveal more wonderful things than those viewed in regard to mere structure and connection (...)”

Marcello Malpighi

Índice

Agradecimentos	3
Índice de Ilustrações	7
Índice de Tabelas	7
Lista de Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract.....	13
I – Introdução	15
II- “Laboratorio Unico Metropolitano”	16
Setor de Microbiologia- Virologia.....	16
Pesquisa de Vírus do Sarampo e da Rubéola	17
Pesquisa de agentes patogénicos responsáveis por gastroenterites	17
Pesquisa de Vírus respiratórios	18
Setor de Retrovírus	22
Pesquisa de HIV	22
• Screening da infecção por HIV	23
• Teste Confirmatório (Teste imunocromatográfico)	24
• Pesquisa de RNA Viral	25
• Determinação de avidéz	26
• Resistência a Fármacos	26
Setor de “Sierologia Infettivologica”	28
Pesquisa de <i>Salmonella typhi</i> e <i>Brucella sp.</i>	30
Pesquisa de <i>Treponema pallidum</i>	30
• Testes não treponémicos	31
• Testes treponémicos	31
Diagnóstico de Hepatite C.....	31
Diagnóstico de Hepatite B	33
Setor CRREM (Centro di riferimento regionale per le emergenze microbiologiche)	33
Pesquisa de Vírus Influenza.....	33
Pesquisa de Vírus da Dengue, Zyka e Chikungunya	34
Pesquisa de vírus West-Nile	36
Setor de “Parassitologia”	39
Pesquisa de <i>Leishmania</i>	39
Pesquisa de parasitas intestinais	41
• Exame parasitológico de fezes	42

• Teste da fita-cola	43
• Teste rápido para <i>Giardia intestinalis</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i>	44
III- Laboratório de “Oncologia e Ematologia”	45
IV- Laboratório de Bioquímica	46
V- Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa	46
Setor de Imunologia, Imunopatologia e Autoimunidade e Imunoserologia.....	47
Eletroforese de proteínas	47
• Imunofixação por subtração	48
• Eletroimunofixação	49
• Pesquisa de bandas oligoclonais em LCR	50
Ensaio fluoroenzimático (FEIA)	51
• Anticorpos anti-transglutaminase tecidual e anti-Gliadina	51
• Anticorpos anti-cardiolipina e anti-β2-glicoproteína I	52
• Anticorpos anti-CCP	52
• Anticorpos anti-dsDNA	52
Imunofluorescência indireta (IFI).....	53
• Anticorpos anti-nucleares (ANA)	53
• Anticorpos anti-dsDNA	55
• Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)	56
• Anticorpos anti-mitocôndria (AMA)	57
• Anticorpos anti-músculo liso (ASMA)	57
• Anticorpos anti-microssomais do fígado e rim (anti-LKM)	58
• Anticorpos anti-célula parietal (PCA)	59
Setor de Hematologia e Hemostase.....	60
VI- Conclusão	61
Bibliografia	62

Índice de Ilustrações

Figura 1- Lâminas escavadas utilizadas para detecção de vírus respiratórios	19
Figura 2- Fluorescência emitida por células infetadas	20
Figura 3- Procedimento do “screening” de vírus respiratórios.....	21
Figura 4- Fluxograma da pesquisa de HIV.....	23
Figura 5- Genius HIV ½ Confirmatory assay	25
Figura 6- Exemplo de relatório de Resistência a Fármacos.....	27
Figura 7- Galeria de determinação de resistência a antibióticos	29
Figura 8- Interpretação de “Widal-Wright”	30
Figura 9- Resultados da genotipagem de HCV	32
Figura 10- SD BIOLINE Dengue Duo kit	36
Figura 11- Visualização da fluorescência em amostras de WNV.....	37
Figura 12- Teste rápido BinaxNow Malária.....	38
Figura 13- Processo de concentração de fezes.....	43
Figura 14- A: Teste de fita-cola; B: ovos de E.vermicularis	44
Figura 15- Teste Immunocard STAT!® Crypto/Giardia	44
Figura 16- Perfil eletroforético de proteínas séricas normal.....	48
Figura 17- Resultado de uma análise, por imunosubtração, das proteínas séricas.....	49
Figura 18- Resultado de uma análise, por imunofixação, das proteínas séricas	50
Figura 19- Padrões de Fluorescência Nuclear em células HEp-2	54
Figura 20- Padrão de fluorescência de AMA em células de HEp-2.....	55
Figura 21- Padrão de Fluorescência de anticorpos anti-dsDNA	55
Figura 22- Padrões de Fluorescência de cANCA (1) e pANCA (2).....	57
Figura 23- Padrão de Fluorescência de ASMA.....	58
Figura 24- Padrão de Fluorescência de anti-LKM	58
Figura 25- A: Padrão de Fluorescência de PCA e de AMA.....	59

Índice de Tabelas

Tabela 1- Padrões nucleares mais comuns	54
---	----

Lista de Abreviaturas

- Ag HBs**- Antígeno de superfície
- AgHBe**- Antígeno de replicação viral
- AMA**- Anticorpos anti-mitocôndria
- ANA**- Anticorpos anti-nucleares
- ANCA**- Anticorpos contra o citoplasma de neutrófilos
- Anti-CCP**- Anticorpos contra péptidos citrulinados cíclicos
- Anticorpo anti-HBc**- Anticorpo anti-core
- Anti-LKM**- Anticorpos anti-microssomais do fígado e rim
- Anti-tTG**- Anti-Transglutaminase tecidual
- APS**- Síndrome Antifosfolípido
- AR**- Artrite Reumatóide
- cANCA**- Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos com padrão citoplasmático
- CBP**- Cirrose Biliar Primária
- CLIA**- Chemiluminiscent immunoassay
- CMIA**- Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay
- CRFs**- Circulating recombinant form
- DNA**- Ácido desoxirribonucleico
- dsDNA**- Double strand DNA
- EBV**- Vírus Epstein-Barr
- EDTA**- Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EIA**- Enzyme immune assay
- ELISA**- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ELP**- Perfil proteico de referência
- ES**- Esclerodermia
- FEIA**- Fluoro-Immuno-Enzymatic method
- GBM**- Membrana glomerular basal
- GDH**- Glutamato Desidrogenase
- HBV**- Vírus da Hepatite B
- HCV**- Vírus da Hepatite C
- HEp-2**- Células epiteliais humanas do carcinoma da laringe
- HIV**- Vírus da imunodeficiência humana
- hMVP**- Metapneumovírus

HPV- Vírus do Papiloma Humano
HRPII- Proteína enriquecida com histidina
HTLV- Vírus T- Linfotrópico Humano
IA- índice de avidéz
IFI- Imunofluorescência indireta
IgA- Imunoglobulina A
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
LAMP- Loop-mediated isothermal amplification
LCR- Líquido cefalorraquidiano
LES- Lúpus Eritematoso Sistémico
MCTD- Doença Mista do Tecido Conjuntivo
MO- Mieloperoxidase
pANCA- Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos com padrão perinuclear
PBS- Phosphate buffered saline
PCA- Anticorpos anti-célula parietal
PCR- Polymerase Chain Reaction
PR3- Proteinase 3
RLUs- Relative light unit
RNA- Ácido ribonucléico
RPR- Rapid plasma reagin
RSV- Vírus respiratório sincicial
RT-PCR- Reverse transcription polymerase chain reaction
SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SS- Síndrome de Sjögren
TBG- Globulina ligadora de tiroxina
TPHA- *Treponema pallidum* hemagglutination assay
UFC- Unidades formadoras de colónias
UV- Ultravioleta
VSM47- Vascular smooth muscle cell

Resumo

O estágio integrou práticas de investigação e de rotina laboratorial nas áreas da Microbiologia, Hematologia e Oncologia no hospital público, *“Policlinico Sant’Orsola-Malpighi da Azienda Ospidaliere-Universitaria di Bologna”* e na área de Bioquímica na *“Facoltà di Farmacia da Università degli Studi di Bologna”*, em Itália. Garantiu o contacto com laboratórios de segurança biológica de nível 3, laboratórios acreditados e de referência, técnicas e metodologias especializadas, culturas celulares, diversos produtos biológicos e agentes patogénicos, como vírus, bactérias e parasitas. No Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, laboratório privado, a área de Hematologia foi mais explorada, permitindo integrar a rotina laboratorial, observação microscópica de esfregaços de sangue e realização das diversas técnicas de controlo de qualidade. Permitiu o acompanhamento das validações, tanto a nível técnico, como a nível biopatológico dos resultados, e o contacto com diversas situações clínicas, como anemias, neoplasias, hemoglobinopatias e doentes com deficiências na coagulação. A área da Imunologia proporcionou maior conhecimento de autoimunidade, conferindo o contacto com diversas técnicas especializadas e situações clínicas. Os sete meses de estágio permitiram a consolidação e a aquisição de vários conhecimentos, necessários à prática laboratorial, o contacto com diversas equipas de trabalho e diversas metodologias. As áreas de Imunologia e de Microbiologia serão descritas pormenorizadamente por terem sido as duas valências escolhidas.

Palavras-chave: Microbiologia; Vírus; Parasitas; Autoimunidade; Imunofluorescência Indireta.

Abstract

The internship integrated research and routine laboratory practices in the areas of Microbiology, Hematology and Oncology at the public hospital, "*Policlinico Sant'Orsola-Malpighi da Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna*" and in the area of Biochemistry at " *Facoltà di Farmacia da Università degli Studi di Bologna*", in Italy. It allowed the contact with level 3 biosafety laboratories, accredited and reference laboratories, specialized techniques and methodologies, cell cultures, various biological products and pathogens, such as viruses, bacteria and parasites. At the "Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa", a private laboratory, the area of Hematology was further explored allowing me to integrate the laboratory routine, microscopic observation of blood smears and the performance of various quality control techniques. It allowed me to follow up the validations, both technically and biopathological, and contact with various clinical situations, such as anemia, neoplasms, hemoglobinopathies and patients with coagulation deficiencies. The area of Immunology provided greater knowledge of autoimmunity, providing contact with various specialized techniques and clinical situations. The seven months of internship allowed the consolidation and acquisition of various knowledge, necessary for laboratory practice, contact with various work teams and methodologies. The areas of Immunology and Microbiology will be described in detail as they were the two valences chosen.

Keywords: Microbiology; Virus, Parasites; Autoimmunity; Indirect Immunofluorescence.

I – Introdução

A área da saúde está cada vez mais evoluída e o laboratório de análises clínicas desempenha um papel, cada vez mais central na prática clínica. Nos últimos anos, foram desenvolvidas várias metodologias e técnicas com o intuito de melhorar a sensibilidade, especificidade e rapidez da resposta laboratorial.

Os laboratórios, cada vez mais automatizados, não dispensam de operadores especializados e o técnico superior de análises clínicas reúne em si, competências e conhecimentos científicos para desenvolver trabalho laboratorial, interpretar e validar resultados, assim como assegurar o controlo e a qualidade dos processos.

O estágio em análises clínicas constitui uma mais-valia na formação dos alunos do Mestrado em Análises Clínicas, tanto pela componente prática e teórica, como pelo contacto com o mundo do trabalho. Este estágio permitiu a consolidação de conhecimentos adquiridos nas diversas unidades curriculares, da mesma forma que permitiu a aquisição de novos conhecimentos, científicos e técnicos e o contacto com diversos setores e profissionais da área.

Este relatório encontra-se dividido de acordo com os diferentes laboratórios e setores que frequentei, estando estes responsáveis pela pesquisa de microrganismos, neles descritas. Ainda assim, é possível verificar que determinados setores são responsáveis pela pesquisa de microrganismos e exercício de diversas técnicas que não são específicas desse mesmo setor, o que acontece por uma questão de logística de recursos humanos e de equipamentos.

Pela impossibilidade de efetuar o estágio completo em Itália, optei por realizar outro estágio, no sentido de complementar a formação já adquirida. Este estágio decorreu em Lisboa, daí que parte do relatório seja referente ao estágio efetuado em Itália e outra parte seja referente àquele efetuado em Lisboa.

II- “Laboratorio Unico Metropolitanano”

O “*Laboratorio Unico Metropolitanano*” (LUM) é uma unidade operativa integrante de diversos hospitais da região de Emilia-Romagna, incluindo o “*Policlinico Sant’Orsola-Malpighi da Azienda Ospidaliere-Universitaria di Bologna*”. Este laboratório, constituído por diversos setores, apresenta um volume de trabalho de 22 milhões de testes por ano e responde às necessidades de toda a região, com 1500 tipos de exames. Diariamente são realizados cerca de 70.000 testes, dos quais 6.000 em estado de emergência, são analisadas mais de 14.000 amostras, provenientes dos 12 hospitais de Bologna e dos 65 pontos de colheita da província.

O serviço de transporte, realizado em concordância com os requisitos técnicos definidos e validados a nível internacional, assegura a transferência das amostras dos pontos de colheita e dos diferentes laboratórios. A ligação funcional entre os diversos setores é assegurada por uma rede informática que permite otimizar a partilha das atividades analíticas a fim de fornecer ao médico/utente o relatório completo a tempo útil.

Setor de Microbiologia- Virologia

O setor de Virologia Geral da Unidade Operativa de Microbiologia do Policlinico S. Orsola Malpighi está sob a coordenação da Professora Tiziana Lazzarotto. Este setor dedica-se à pesquisa de vírus, assim como a monitorização e acompanhamento de infeções congénitas. É o laboratório responsável pela pesquisa de vírus herpes, adenovírus, vírus respiratórios, enterovírus, vírus do sarampo, parvovírus B19, HPV, vírus da rubéola, citomegalovírus, vírus da família *Polyomaviridae*, e ainda gastroenterites.

Este laboratório é uma unidade de referência da Região de Emilia-Romagna e apoia o diagnóstico e monitorização de Sarampo e Rubéola. É, também, uma unidade de referência para o diagnóstico de Tosse Convulsa, cuja etiologia é uma bactéria, mas por ser uma infeção que afeta principalmente crianças, assim como o sarampo e a rubéola, é diagnosticada neste setor. A pesquisa de retrovírus é realizada no setor de retrovírus que está sob coordenação da Professora Maria Paola Landini, onde é assegurada a pesquisa de HIV e HTLV, monitorização da infeção, assim como estudos de resistência a fármacos.

Pesquisa de Vírus do Sarampo e da Rubéola

O diagnóstico da infecção pelos vírus do sarampo e da rubéola é feito através da pesquisa de anticorpos no soro do utente. Para tal, é utilizando o equipamento Cobas® 8000 da Roche, que faz uso de um imunoensaio quimioluminiscente (CLIA). Este imunoensaio utiliza uma fase sólida revestida de antígenos aos quais se irão ligar os anticorpos, presentes na amostra do doente. De seguida, é adicionado um segundo anticorpo ligado a uma enzima, contra os anticorpos humanos. Por fim adiciona-se o substrato luminiscente dessa enzima, levando à emissão de luminiscência, o que evidencia a presença de anticorpos contra os vírus.

Para o teste confirmatório, de resultados positivos, são necessárias uma amostra de urina, que é dividida em duas alíquotas e uma amostra de exsudado orofaríngeo. Uma das alíquotas é urina total, enquanto a segunda alíquota é centrifugada para obtenção das células presentes, descartando o sobrenadante e ressuspendendo as células em PBS. De seguida, procede-se à extração de RNA, das amostras de urina total, células da urina e exsudado orofaríngeo, utilizando o extrator NUCLISENS®easyMAG® da Biomérieux. São adicionados 2 mL de tampão de lise à amostra, e após 10 min adicionam-se esferas de sílica magnéticas às quais se vão ligar os ácidos nucleicos. De seguida, são efetuadas várias lavagens, seguidas da eluição, onde através do calor, os ácidos nucleicos são libertados da sílica. De seguida, o sistema atrai as esferas, separando-as do eluato e por fim, procede-se a um RT-PCR, cujos “targets” são o gene N (nucleoproteína), no caso do vírus do Sarampo e o gene EI (envelope), no caso do vírus da Rubéola. [1]

Pesquisa de agentes patogénicos responsáveis por gastroenterites

A pesquisa de agentes patogénicos responsáveis por gastroenterites é feita em fezes, com recurso ao equipamento DiaSorin LIAISON®, que faz uso de um imunoensaio quimioluminescente (CLIA), para pesquisa de antígenos. Este imunoensaio utiliza uma fase sólida revestida de micropartículas magnéticas que se encontram cobertas de anticorpos específicos contra os microrganismos que se pretende pesquisar. Os antígenos presentes na amostra irão ligar-se aos anticorpos das micropartículas. É, depois, adicionado um segundo anticorpo contra estes antígenos. Este anticorpo encontra-se associado a uma enzima e após adição do seu substrato, ocorre emissão de luminiscência. Na pesquisa de adenovírus, rotavírus e *Helicobacter pylori*, este imunoensaio faz a determinação qualitativa de um antígeno

do microrganismo, já no caso de *Escherichia coli* enterohemorrágica, é feita uma detecção qualitativa das toxinas *Shiga 1* e *Shiga 2*. [2] [3] Quanto ao *Clostridium difficile*, é feito um teste de *screening* através da pesquisa de Glutamato Desidrogenase (GDH), um enzima produzido em grandes quantidades por esta bactéria. A luz emitida é proporcional à concentração de enzima, presente nas fezes. No caso de obtermos um resultado positivo para *C. difficile* é feita uma pesquisa qualitativa das toxinas A e B, utilizando o mesmo ensaio de forma a confirmar o teste de *screening*. Caso esta pesquisa seja negativa é feito um PCR em tempo real, um método mais sensível que permite discriminar qual o tipo de toxina presente na amostra. [44]

Pesquisa de Vírus respiratórios

A pesquisa de vírus respiratórios pode ser feita em aspirados nasofaríngeos e traqueais, lavados nasais e lavados broncoalveolares. Para esta pesquisa é utilizado o kit “Light Diagnostics™ SimulFluor® Respiratory Screen”, que utiliza imunofluorescência direta para detetar a presença de antígenos dos vírus Influenza A, Influenza B, Adenovírus, Vírus Respiratório Sincicial (RSV), Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 e Metapneumovírus (hMPV), utilizando uma lâmina escavada (Figura 1). Este kit utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos para detetar e identificar Metapneumovírus num poço e RSV num outro poço, no qual também se faz o *screening* de Influenza A, Influenza B, Adenovírus e Parainfluenza 1, 2 e 3. Este método utiliza 2 reagentes, 1 deles com anticorpos contra metapneumovírus e um outro com anticorpos específicos para cada um dos restantes vírus: Influenza A, Influenza B, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 e RSV. Os anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, irão ligar-se aos antígenos virais presentes na amostra e posteriormente são detetados através de fluorescência com recurso a um microscópio de fluorescência (Figura 2). [5]

Para metapneumovírus, um resultado positivo traduz-se na presença de grânulos intracelulares que emitem fluorescência verde maçã. No *screening* de vírus Influenza A, Influenza B, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Parainfluenza 3, as células infetadas apresentam fluorescência verde maçã no núcleo e/ou citoplasma, ao invés das células infetadas por RSV que emitem uma fluorescência amarela/dourada no citoplasma, permitindo distingui-las dos outros vírus respiratórios, uma vez que a reação antígeno-anticorpo ocorre no mesmo poço. As células não infetadas apresentam uma cor vermelha, devido à presença de Evans Blue nos reagentes.

Após obtenção de um resultado positivo para os vírus Influenza A, Influenza B, Adenovírus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 e Parainfluenza 3 é necessário discriminar os diferentes vírus e para tal é utilizada outra lâmina escavada. Num poço é colocado um reagente com anticorpos específicos marcados para Parainfluenza e anticorpos específicos marcados para Adenovírus. Num outro poço, são colocados anticorpos específicos marcados para vírus Influenza A e anticorpos específicos marcados para Influenza B. No poço para Parainfluenza e Adenovírus, um resultado com células emissoras de fluorescência verde maçã indica a presença de Parainfluenza e células emissoras de fluorescência amarelo/dourado indica a presença de Adenovírus. Assim, torna-se necessário usar um outro reagente com anticorpos específicos marcados com fluorocromos para Parainfluenza 1, anticorpos específicos marcados com fluorocromos para Parainfluenza 2 e anticorpos específicos marcados com fluorocromos para Parainfluenza 3. Caso se obtenham células emissoras de fluorescência verde estamos perante Parainfluenza 1 ou 2, caso a fluorescência seja amarelo/dourado estamos perante Parainfluenza 3. No poço para discriminar os vírus Influenza, fluorescência verde indica Influenza A e fluorescência amarelo/dourado indica Influenza B (Figura 3). [6]



Figura 1- Lâminas escavadas utilizadas para deteção de vírus respiratórios

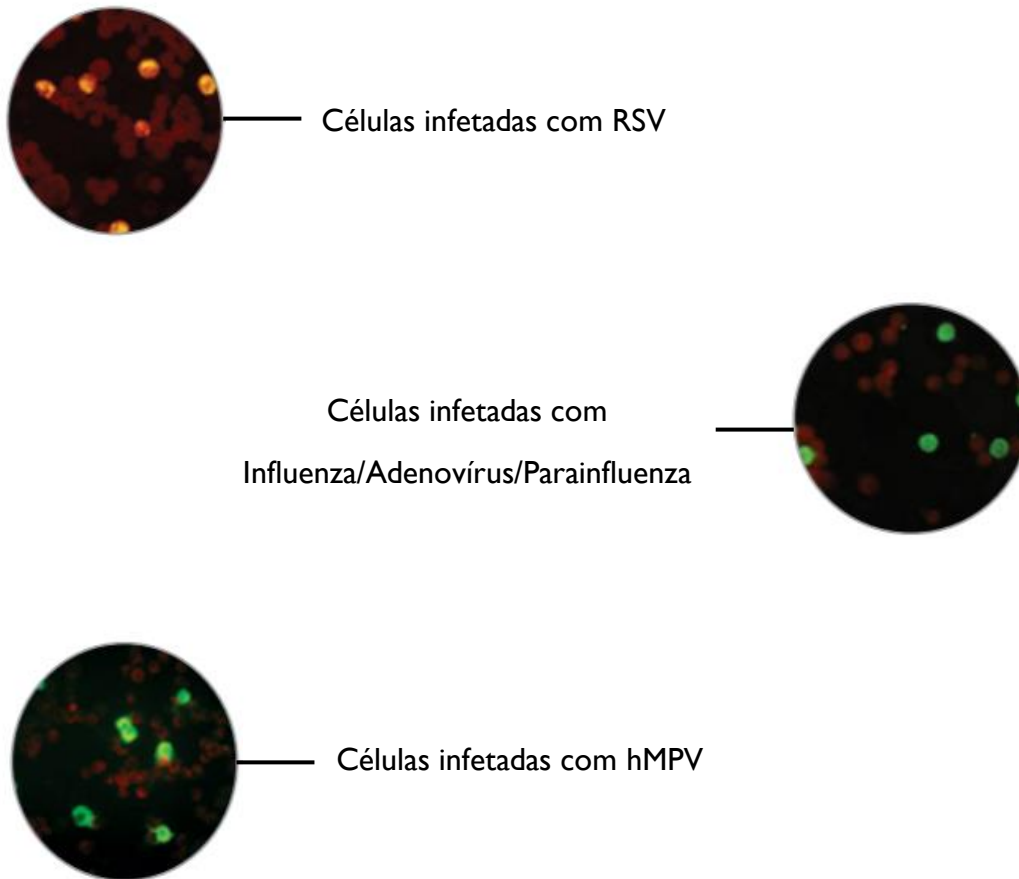
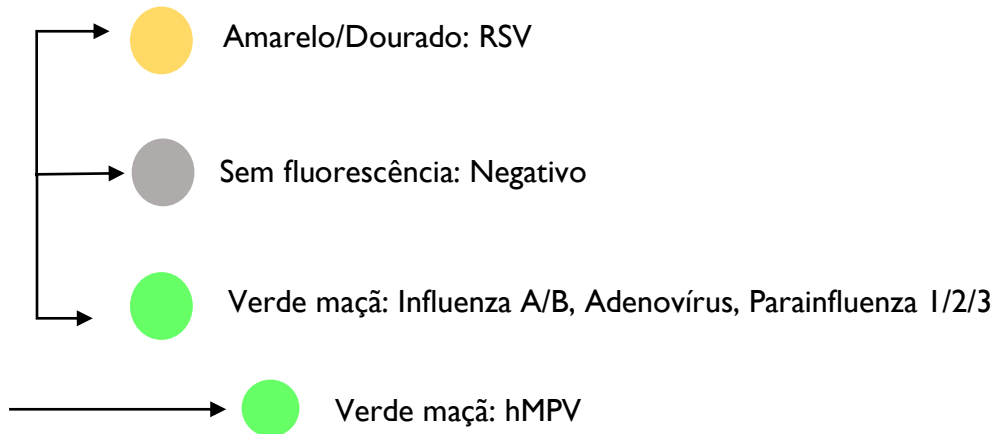


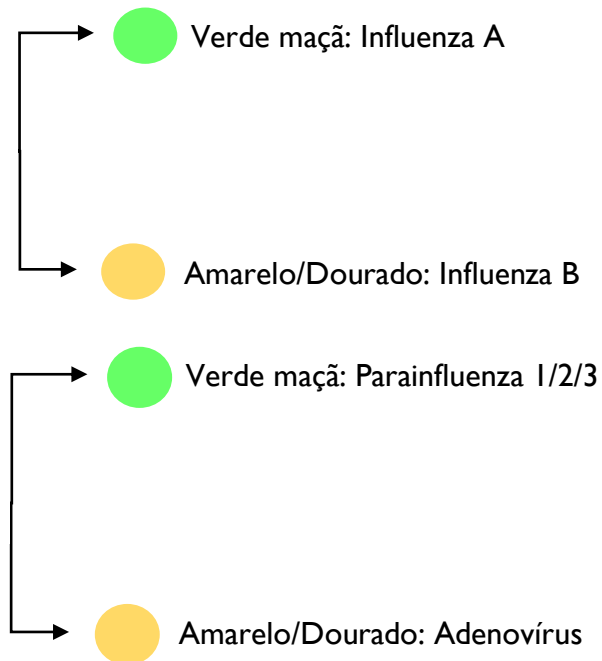
Figura 2- Fluorescência emitida por células infetadas

Fonte: “Light Diagnostics™ products for infectious disease” brochure

• **1° PASSO:**



• **2° PASSO:**



• **3° PASSO:**

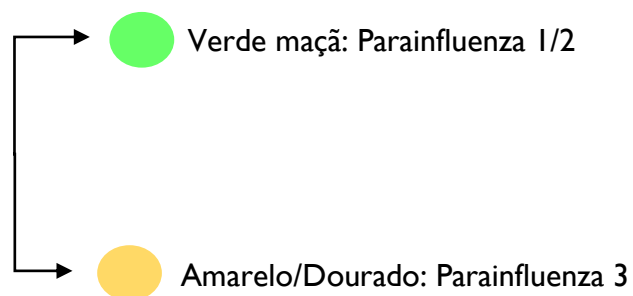


Figura 3- Procedimento do "screening" de vírus respiratórios

Setor de Retrovírus

Este setor é o Centro de referência regional para pesquisa virológica e investigações serológicas necessárias à pesquisa do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e realiza cerca de 80 000 exames, anualmente. É o responsável pela pesquisa de Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo I e II (HIV I e HIV II) e de Vírus T- Linfotrópico Humano do Tipo I e II (HTLV I e HTLV II). Neste laboratório faz-se a determinação da presença destes vírus através de pesquisas serológicas, utilizando testes imunoenzimáticos, de eletroquimioluminiscência, e testes imunocromatográficos e imunoblotting para a confirmação da positividade da infeção. A quantificação dos ácidos nucleicos de HIV e HTLV é feita com recurso a métodos moleculares, assim como a sequenciação para a determinação do tropismo viral e resistência à terapêutica para HIV I e HIV 2.

Pesquisa de HIV

O vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um retrovírus transmitido através de relações sexuais desprotegidas, contacto com sangue contaminado e transmissão por via vertical, de mãe para filho. Este vírus infeta as células do sistema imunitário, nomeadamente os linfócitos T CD4, macrófagos e células dendríticas. O HIV está na origem da Síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), que se caracteriza pela diminuição do número de linfócitos T CD4, uma doença sem cura, mas cuja terapia permite ao doente ter uma melhor qualidade de vida. O HIV é classificado em HIV I e HIV II, de acordo a sua estrutura genómica, sendo o primeiro o mais patogénico e predominante no mundo e o segundo o mais raro, contudo o mais comum na África Ocidental. O HIV-I é ainda subdividido em 4 grandes grupos, de acordo com as variações na região do envelope (env): M o “major”, responsável pela maioria das infeções e os grupos N, O e P. O grupo M é ainda subdividido em 9 subtipos: A, B, C, D, E, F, G, H, J e K e estes subtipos podem recombinar-se dando origem a um vírus híbrido, conhecido como “*circulating recombinant form*” (CRFs). [7] [8]

O fluxograma da pesquisa de HIV é complexo e a metodologia a usar depende do resultado da análise anterior (Figura 4).

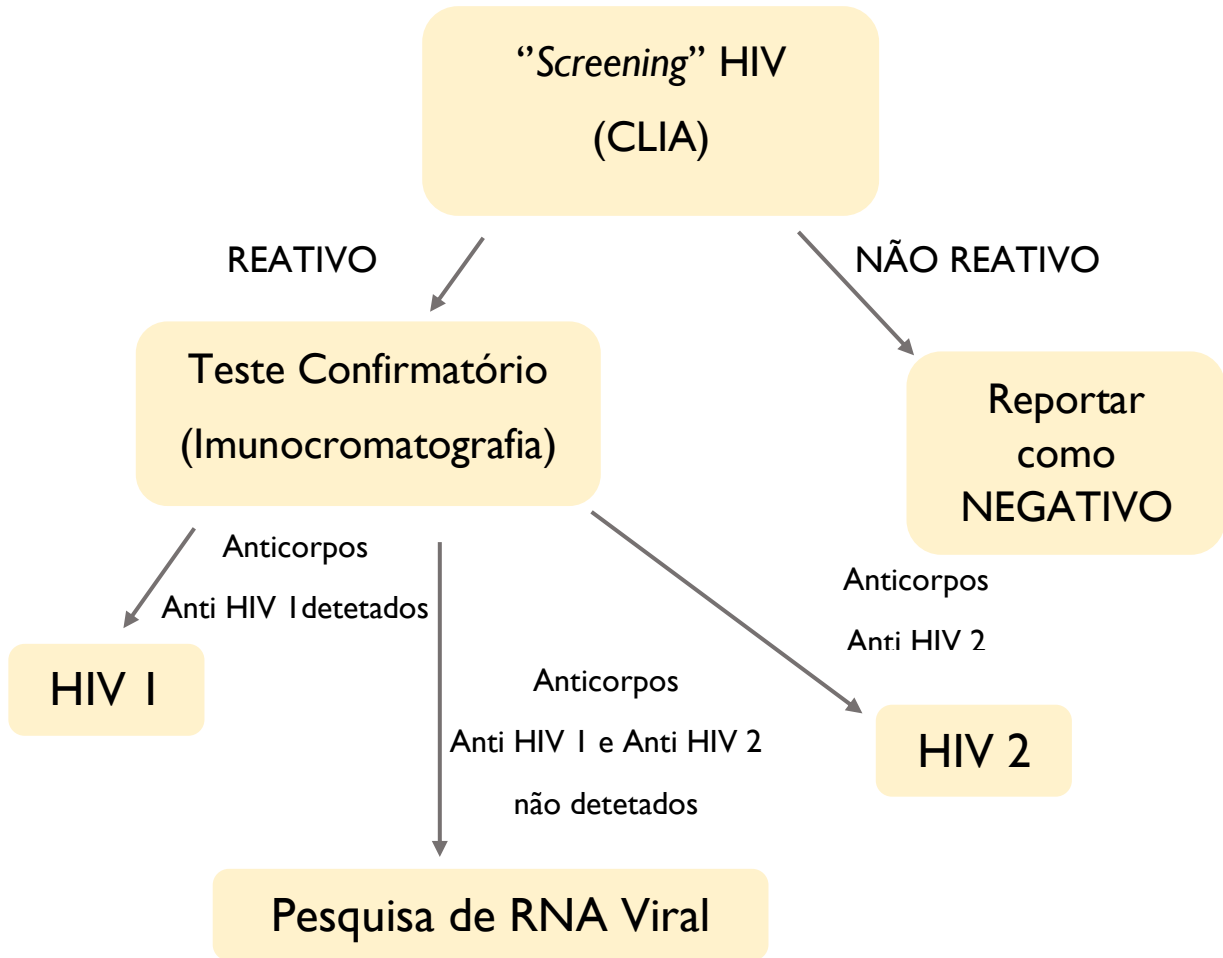


Figura 4- Fluxograma da pesquisa de HIV

- **Screening da infecção por HIV**

O *screening* da infecção por HIV é feito em amostras de soro, plasma ou em casos de infecção mais graves, LCR, com recurso ao equipamento Cobas® 8000 da Roche que processa as amostras de forma automatizada, fazendo uso de um imunoensaio quimioluminiscente, para pesquisa de antígenos e anticorpos virais. Neste ensaio ocorre emissão de luminiscência aquando da conversão do substrato por parte das enzimas utilizadas e esta luminiscência indica a presença do antígeno viral, a proteína p24 (proteína da cápside viral) ou anticorpos contra a proteína gp41 (glicoproteína do envelope) do HIV 1 e gp36 (glicoproteína do envelope) do HIV 2. Um resultado reativo não distingue a presença de p24 dos anticorpos anti-HIV 1 e anti-HIV 2. O resultado da reação quimioluminiscente é medido em "RLUs" e existe uma relação

direta entre a presença de antígeno p24 e anticorpos anti HIV1 e anti HIV 2, com a luminescência emitida. Este sinal é comparado com um “cut-off”, e podemos obter:

- Sinais com valores $\geq 1,00$ – reativos para o antígeno p24 ou anticorpos anti HIV1/HIV2;
- Sinais com valores $< 1,00$ – não reativos. [9]

• **Teste Confirmatório (Teste imunocromatográfico)**

O teste utilizado para confirmar os resultados positivos obtidos no teste de *screening* é o teste GeniusTM HIV 1/2 Confirmatory assay, um teste imunocromatográfico que permite confirmar a presença de anticorpos contra HIV 1 ou HIV 2. As amostras usadas podem ser sangue, plasma e soro. A detecção é feita através da ligação, que ocorre numa fase membranar sólida, entre os anticorpos da amostra a antígenos HIV 1 (p31, gp160, p24, gp41) e antígenos HIV 2 (gp36, gp140), presentes na tira de teste. A amostra é colocada num poço da cassete, juntamente com o tampão e depois destes migrarem na tira imunocromatográfica, adiciona-se tampão num outro poço. Este tampão permite a migração lateral dos produtos e promove a ligação anticorpo-antígeno. A presença de um controlo é necessária para validar este teste, onde a ligação da imunoglobulina G presente na amostra à proteína A, imobilizada na tira, permite o aparecimento uma banda rosa/roxa. Esta proteína A é sintética, encontrando-se conjugada a partículas coloidais de ouro coradas, antígenos HIV 1 e HIV 2 e por esta razão, é utilizada como banda controlo. [10]

Numa amostra reativa, os anticorpos anti-HIV ligam-se aos antígenos que se encontram imobilizados na tira (Figura 5: banda 1 a 6), sendo possível observar bandas rosas/roxas. A interpretação dos resultados é um pouco complexa, e baseia-se na presença de determinadas bandas na tira teste. Para HIV 1, um resultado positivo é determinado pela presença de quaisquer duas das quatro bandas teste para HIV 1 com pelo menos as bandas gp160 (Figura 5: banda 4) ou gp41 (Figura 5: banda 6). Para HIV 2, um resultado positivo é determinado pela presença das duas bandas teste para HIV 2, a gp36 (Figura 5: banda 1) e gp140 (Figura 5: banda 2). Em ambos os casos, o resultado negativo é determinado pela ausência de bandas e um resultado indeterminado traduz-se numa combinação diferente de bandas, sendo necessário fazer a detecção qualitativa de DNA. [11]



Figura 5- Genieus HIV 1/2 Confirmatory assay

Legenda:

Banda 1: gp36 (HIV-2, péptido do envelope)

Banda 2: gp140 (HIV-2, péptido do envelope)

Banda 3: p31 (HIV-1, polimerase)

Banda 4: gp160 (HIV-1, proteína recombinante do envelope)

Banda 5: p24 (HIV-1, proteína recombinante do core)

Banda 6: gp41 (Grupo M e O) (HIV-1, péptidos do envelope)

Banda controlo: Proteína A

• Pesquisa de RNA Viral

A quantificação de RNA viral permite determinar a carga viral no plasma do utente e é feita com recurso ao equipamento COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan® da Roche. Este instrumento prepara as amostras de forma automatizada, efetua a transcrição reversa, a amplificação por PCR e a consequente quantificação de RNA viral. A utilização de sondas fluorescentes possibilitam a deteção em tempo real dos produtos de PCR e os resultados são expressos em cópias por mililitro (cp/ml). [12]

Em recém-nascidos de mães seropositivas, o diagnóstico da infeção por HIV passa pela execução de Western Blot, deteção qualitativa de DNA e carga viral, necessários para despistar uma possível infeção em recém-nascidos. [13]

- **Determinação de avides**

A determinação da avides é útil do ponto de vista da saúde pública e do próprio doente, como tentativa de rastrear a origem da infeção. Esta é determinada após uma pesquisa positiva de HIV e permite determinar se a ligação antígeno-anticorpo é uma ligação forte ou fraca. A amostra de soro é dividida em duas alíquotas e ambas são diluídas com diferentes soluções. Numa adiciona-se guanidina (um agente desnaturante) e na outra, uma solução de tampão fosfato (PBS). Ambas as amostras são testadas, utilizando o instrumento Abbott Architect i1000SR que faz uso de um “Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay” (CMIA), que permite a deteção de anticorpos contra HIV 1 e HIV 2 e do antígeno p24, através da emissão de luminescência. A medição da luminescência é comparada com um “cut-off” e após a obtenção dos resultados para ambas as amostras é necessário fazer o seguinte cálculo:

$$IA = \frac{\text{Resultado da alíquota com guanidina}}{\text{Resultado da alíquota com PBS}}$$

As infeções são classificadas como recentes se o resultado do índice de avides (IA) é inferior a 0,6 e infeção estabelecida se o resultado do IA é igual ou superior a 0,6. Este critério estabelece ainda que uma infeção recente foi contraída nos últimos 6 meses e que uma infeção estabelecida terá sido contraída há mais de 6 meses. [14]

- **Resistência a Fármacos**

A genotipagem do vírus e a determinação da resistência a fármacos permite estabelecer a resistência/sensibilidade para os anti-retrovirais utilizados. Este processo é feito em doentes “naive”, isto é, doentes que foram diagnosticados pela primeira vez e que ainda não foram submetidos a qualquer terapêutica, ou em situações de insucesso terapêutico. Para tal, são, normalmente, sequenciados os genes que codificam as duas regiões alvo da terapia: a transcriptase reversa e a integrase. [15]

O primeiro passo é a extração de RNA viral de uma amostra de plasma do utente, com recurso ao extrator NUCLISENS®easyMAG® da Biomérieux, seguido de PCR. No caso da integrase é necessário fazer 1 RT-PCR, utilizando dois primers e no caso da transcriptase reversa é necessário fazer um Nested PCR, utilizando 7 primers. De seguida, faz-se uma

eletroforese de forma a permitir quantificar os produtos amplificados e determinar, se é necessário fazer diluições. Após isto, é feita a sequenciação, utilizando o ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer e as sequências são analisadas, utilizando o programa informático SeqMan Pro module (v7.1.0). Os eletroferogramas obtidos são comparados e verificam-se os locais de “mismatch”, isto é, locais onde não ocorre o alinhamento das sequências. As sequências, obtidas a partir desta verificação, são comparadas com sequências presentes na base de dados, de forma a ser possível determinar o subtipo do HIV e consequente padrão de resistência/sensibilidade à terapêutica (Figura 6). [16]

ViroSeq® HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Report

Patient ID:		Institution Name:	A. O. B. Garcia - Mapingu
Accession Number:		Report Generated by:	Administrador
Sample Name:		Report Date & Time:	Feb 21, 2019 1:56:42 PM

Drug Resistance:

NRTI Class	Evidence of Resistance
EMTRIVA® (emtricitabine, FTC)	None
EPIVIR® (lamivudine, 3TC)	None
RETROVIR® (zidovudine, ZDV)	None
VIDEX® (didanosine, ddl)	None
VIREAD® (tenofovir, TDF)	None
ZERIT® (stavudine, d4T)	None
ZIAGEN® (abacavir, ABC)	None

NNRTI Class	Evidence of Resistance
EDURANT® (rilpivirine, RPV)	None
INTELENCE® (etravirine, ETR)	None
SUSTIVA® (efavirenz, EFV)	None
VIRAMUNE® (nevirapine, NVP)	None

PI+ Class	Evidence of Resistance
APTIVUS® (tipranavir, TPV)	None
CRIXIVAN® (indinavir, IDV)	None
FORTOVASE® / INVIRASE® (saquinavir, SQV)	None
KALETRA® (lopinavir + ritonavir, LPV)	None
LEXIVA® (fosamprenavir, FPV)	None
PREZISTA® (darunavir, DRV)	None
REYATAZ® (atazanavir, ATV)	None
VIRACEPT® (nelfinavir, NFV)	None

- NOTE: At least one mutation used to determine Evidence of Resistance for this drug has not been fully validated.
 - NOTE: At least one mutation used to determine Evidence of Resistance for this drug has not been clinically verified.
 - NOTE: For at least one mutation used to evaluate Evidence of Resistance for this drug, both notes above apply.
 - Evidence of Resistance for Protease Inhibitors estimates response to ritonavir-boosted regimens. Refer to section titled "Notes on Evidence of Resistance"

Notes on Evidence of Resistance:

Resistance	Mutations present constitute a high level of genetic evidence for viral resistance
Possible Resistance	Mutations present suggest the possibility of viral resistance
None	There is insufficient evidence for viral resistance

The protease inhibitor (PI) evidence of resistance interpretations were developed to estimate the expected virological response to standard doses of protease inhibitors with pharmacokinetic boosting by ritonavir. This has become the most common method of administering each of the protease inhibitors, except nelfinavir (ref. 1), to ensure adequate drug levels in all patients. Boosted PIs are more active in the presence of resistance than non-boosted PIs. (ref. 2,3)

Figura 6- Exemplo de relatório de Resistência a Fármacos

Setor de “Sierologia Infettivologica”

Este setor realiza cerca de 630 000 exames anualmente e é o responsável pelo *screening* serológico de diversos agentes patogênicos, tais como bactérias, fungos, vírus e parasitas. Apesar de se denominar como Setor de “Sierologia Infettivologica”, por uma questão de gestão de recursos, é o setor responsável pelo diagnóstico de infecções congênitas e a quantificação dos vírus das hepatites B e C. É considerado o Centro de referência de Resistência a Fármacos para Vírus da Hepatite C e faz uso de métodos moleculares para a pesquisa de ácidos nucleicos e determinação de genomas e mutações destes vírus, associadas às resistências a fármacos. É, ainda, responsável pela pesquisa de *Mycoplasma* sp., vírus das Hepatites, *Borrelia burgdorferi*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, entre outros, e utiliza métodos como a quimioluminescência, ensaios imunoenzimáticos e testes de aglutinação para pesquisa de anticorpos e antígenos.

Pesquisa de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*

Ureaplasma urealyticum e *Mycoplasma hominis* são duas bactérias comensais do trato urogenital, mas que em situações de imunodepressão podem levar a infecções com consequência graves, tais como infertilidade, aborto espontâneo e infecção pulmonar em recém-nascidos. Por estas razões, é importante o diagnóstico rápido destas infecções, e caso se obtenha um resultado positivo para a pesquisa destas bactérias, em grávidas, é necessário fazer um teste de resistência a antibióticos. Este teste de resistência só é efetuado em utentes grávidas ou utentes que tenham um resultado anterior positivo para estas bactérias. Para a detecção destas bactérias, podem ser utilizadas amostras de urina, líquido seminal, exsudados endocervical, vaginal e uretral. [17]

Para a pesquisa destas bactérias, é utilizado o *kit MycoView Medium* da Zeakon Diagnostics, que tem como base o metabolismo da ureia pelo *U. urealyticum*, o metabolismo da arginina por parte do *M. hominis* e a resistência natural de *U. urealyticum* e *M. hominis*, respetivamente à lincomicina e eritromicina. Este *kit* é composto por dois frascos que contêm meios distintos, um deles contém um meio de transporte e o outro contém um meio de cultura, composto por arginina, ureia e vermelho de fenol, um indicador de pH, que permite detetar a presença das bactérias, através de uma mudança de cor do meio de cultura, após

incubação. Numa primeira fase, são inoculados 200 μL de amostra no meio de transporte e posteriormente são colocados 200 μL , do meio de transporte inoculado, no meio de cultura. O meio de transporte é colocado no frigorífico a 4°C e o meio de cultura é incubado a 37°C, durante 72h, no caso da urina e líquido seminal e 48h, para as restantes amostras. Após este período, é feita a leitura da mudança de cor, comparando as cores de ambos os frascos, sendo que numa amostra positiva ocorre mudança de cor do meio de cultura, de amarelo/alaranjado para rosa/avermelhado e indica a presença de bactérias numa concentração $\geq 10^4 \text{UFC/mL}$. [18]

No caso de utentes grávidas e utentes com resultados anteriores positivos efetua-se um teste de resistência a antibióticos. Para tal, é utilizado o kit MicoView que testa a resistência a 9 antibióticos: Lincomicina, Eritromicina, Roxitromicina, Azitromicina, Josamicina, Minociclina, Doxiciclina, Ofloxacina e Ciprofloxacina. São inoculados 100 μL de amostra do meio de transporte, nos 12 poços da galeria e colocam-se 2 gotas de óleo de parafina, posteriormente a galeria é incubada a 36°C durante 24h. Após 24h é feita a leitura da galeria, através da mudança colorimétrica de cada poço de amarelo/alaranjado para rosa/avermelhado, o que indica um meio mais alcalino. Um poço amarelo nos testes de resistência a antibióticos indica sensibilidade e um poço vermelho indica resistência (Figura 7). [19]

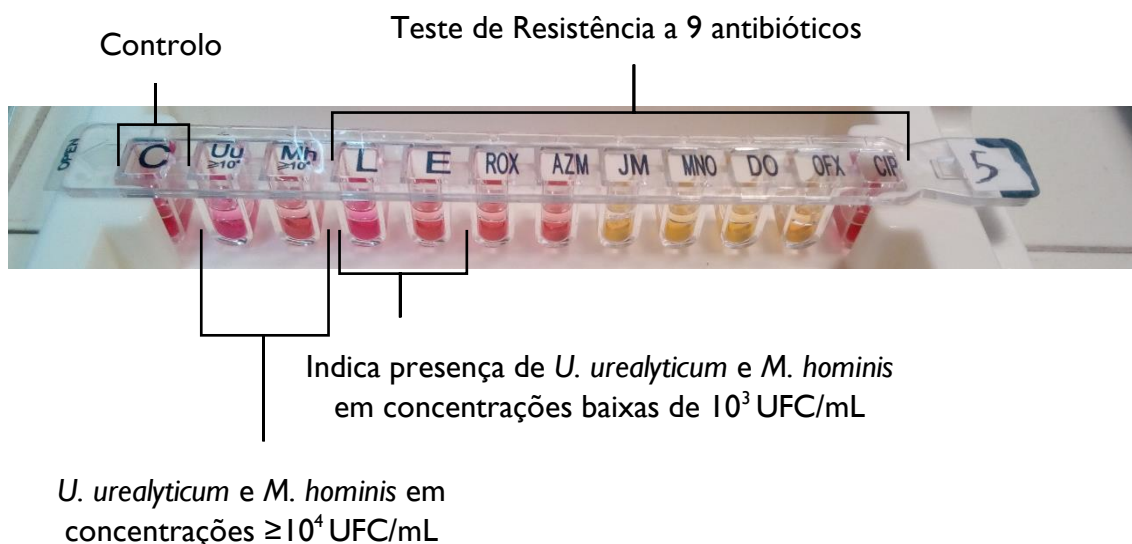


Figura 7- Galeria de determinação de resistência a antibióticos

Pesquisa de *Salmonella typhi* e *Brucella sp.*

Salmonella typhi é a principal causa de febre tifóide e leva ao aparecimento de outros sintomas tais como fraqueza e cefaleia, comuns à infecção causada por *Brucella sp.* [20]

Infeções por estas bactérias podem ser fatais e daí a importância do seu diagnóstico. A reação de Widal Wright permite dar um resultado presuntivo sobre a presença de *Salmonella typhi* e *Brucella sp.* e consiste num teste serológico que permite a quantificação dos anticorpos anti-O (somático) e anti-H (flagelar) de *S. typhi* e anticorpos contra *Brucella sp.*, presentes no soro do utente. [21] Primeiro, o soro do utente é incubado com os diferentes antígenos em 3 diferentes poços. Para cada um destes poços, são feitos o controlo negativo, através de diluições do soro do utente com soro fisiológico, e controlo positivo que utiliza uma amostra de soro, conhecida como positiva, para cada um dos anticorpos. Numa amostra positiva, os anticorpos ligam-se aos antígenos, e uma vez que os antígenos se encontram associados a partículas coradas, a aglutinação é visível macroscopicamente. Ao invés, o resultado negativo traduz-se na formação de um “botão” muito corado, no fundo do poço. Após a obtenção de um resultado positivo, o soro do utente é diluído numa microplaca em 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, com os antígenos correspondentes, em 3 colunas diferentes e o resultado é dado em função da última diluição, na qual é visível a aglutinação (Figura 8). [22]

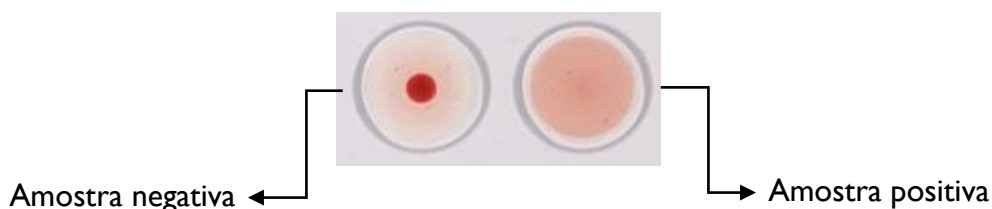


Figura 8- Interpretação de “Widal-Wright”

Pesquisa de *Treponema pallidum*

A sífilis é uma doença infecciosa curável, que pode ser transmitida sexualmente ou por via vertical, durante a gestação. Esta doença é causada pela bactéria *Treponema pallidum* e pode apresentar diferente sintomatologia clínica, consoante os diferentes estádios de infecção. A pesquisa laboratorial é feita com base em testes serológicos e estes são divididos em testes não treponémicos (testes de *screening*) e testes treponémicos (testes de confirmação). [23]

- **Testes não treponémicos**

Para os testes não treponémicos, são utilizadas amostras de soro ou plasma e estas são submetidas ao RPR (“*rapid plasma reagin*”), um teste não específico, que permite a detecção de reaginas, anticorpos que se formam na presença de cardiolípinas. Estas cardiolípinas são libertadas quando ocorre destruição celular, como no caso da sífilis e por esta razão, é um teste pouco específico. Este teste utiliza suspensões antigénicas que contêm cardiolípinas a revestir partículas de carvão e após a aglutinação é possível a observação macroscópica dos resultados. Caso se obtenha um resultado positivo, a amostra é submetida a um teste de quimioluminescência (CLIA) para pesquisa de anticorpos, específicos de *T.pallidum*. [24]

- **Testes treponémicos**

Os resultados positivos dos testes não treponémicos devem ser confirmados por testes treponémicos, testes mais específicos. O TPHA (“*Treponema pallidum hemagglutination assay*”) é um desses testes e tem como base a hemaglutinação de eritrócitos revestidos de antígenos de *T. pallidum* que irão reagir com os anticorpos específicos, presentes no soro ou plasma do utente, permitindo a visualização macroscópica desta reação. [25]

Diagnóstico de Hepatite C

A hepatite C é uma doença viral causada pelo vírus da Hepatite C (HCV), que na maioria das vezes não apresenta sintomas detetáveis e cuja transmissão ocorre por meio de sangue contaminado. O diagnóstico da infeção por HCV passa pela pesquisa de anticorpos anti-HCV, usando o imunoensaio CMIA e pela pesquisa RNA viral. [26]

O genoma deste vírus é altamente variável e de acordo com o genótipo, o vírus é classificado em 6 grupos diferentes e cada um destes grupos tem uma ou mais variantes. Uma vez que o quadro clínico do doente, a terapêutica a aplicar e a sua duração está relacionada com o genótipo e variante do vírus, é necessário fazer a genotipagem viral. Para tal é feita a extração de RNA viral, a partir de amostras de soro ou plasma com recurso ao extrator QIASymphony SP da QUIAGEN, seguidamente faz-se um RT-PCR, usando dois pares de “primers” biotinilados de forma a obter duas regiões de DNA biotinilados, 5’UTR e a região do “core”. Por fim, faz-se a genotipagem do vírus recorrendo ao equipamento VERSANT HCV

Genotype 2.0 Assay da SIEMENS, um ensaio de sondas em linha, que permite a identificação do genótipo e da variante do vírus em estudo.

O produto de DNA biotilado é hibridado com sondas que se encontram ligadas a uma tira de nitrocelulose e o DNA não hibridado é retirado com lavagens. A estreptavidina conjugada com a fosfatase alcalina liga-se ao DNA biotilado, formando o complexo de estreptavidina-fosfatase alcalina que vai reagir com um cromogéneo, formando um precipitado de cor púrpura/castanha, produzindo um padrão de bandas, na tira de nitrocelulose. Nestas tiras existem 3 bandas de controlo e 22 bandas de DNA que possuem as sequências dos diferentes 6 genótipos de HCV. A interpretação dos resultados é feita, comparando os padrões das bandas nas tiras com os padrões da tabela de interpretação, com ajuda de um cartão de leitura (Figura 9). [27]



Figura 9- Resultados da genotipagem de HCV

Legenda:

- | | | |
|----------------|--------------------|-----------------------|
| 1- Genótipo 1a | 8- Genótipo 2a/2c | 15- Genótipo 2 |
| 2- Genótipo 3a | 9- Genótipo 3a | 16- Genótipo 4a/4c/4d |
| 3- Genótipo 1b | 10- Genótipo 2a/2c | 17- Genótipo 3a |
| 4- Genótipo 1a | 11- Genótipo 3a | 18- Genótipo 1b |
| 5- Genótipo 1a | 12- Genótipo 1a | 19- Genótipo 3a |
| 6- Genótipo 3a | 13- Genótipo 2a/2c | 20- Genótipo 2 |
| 7- Genótipo 3a | 14- Genótipo 1b | |

Diagnóstico de Hepatite B

A hepatite B é causada pelo vírus da hepatite B (HBV) e tal como o vírus da hepatite C, é transmitido através de sangue contaminado. A pesquisa desta infeção é feita com base na serologia, utilizando o imunoensaio CMIA, onde se faz a pesquisa de antígenos e anticorpos específicos. O antígeno de superfície (Ag HBs), é o primeiro a surgir e a sua presença indica sempre infeção e o anticorpo anti-HBs é um marcador de infeção passada ou vacinação. O anticorpo anti-HBc é um anticorpo contra o “core” e indica infeção aguda, o marcador de replicação viral AgHBe está associado a um maior risco de contágio e o anticorpo anti-HBe, está associado a um menor risco de contágio. [28]

Setor CRREM (Centro di riferimento regionale per le emergenze microbiologiche)

O setor CRREM (“Centro di riferimento regionale per le emergenze microbiologiche”) que está sob a coordenação da Professora Maria Paola Landini, realiza anualmente, cerca de 20 000 exames, sendo o responsável pela realização de estudos e pesquisa de microrganismos que podem levar a problemas de saúde pública, nomeadamente infeções emergentes que podem estar relacionadas com a globalização, alterações climáticas ou bioterrorismo.

Este laboratório é responsável pela pesquisa de arbovírus (como por exemplo, vírus Chikungunya, Dengue, Zika, Febbre amarela, West Nile, Usutu e vírus Toscana), malária, leishmaniose cutânea e visceral, vigilância de doenças bacterianas invasivas e das formas graves e complicadas do vírus Influenza. Para tal, usa testes moleculares qualitativos e quantitativos, testes serológicos, testes imunocromatográficos, microscopia de fluorescência, entre outros.

Pesquisa de Vírus Influenza

O vírus influenza é o responsável pela gripe, uma doença respiratória, que ocorre com maior incidência no período de Inverno. Esta infeção é transmitida principalmente pelas secreções respiratórias, transmitidas pelo ar. Os sintomas incluem febre, tosse e dores

musculares e apesar de ser uma doença autolimitante pode causar quadros clínicos mais complicados, em imunodeprimidos e idosos. Os vírus Influenza são classificados de acordo com características antigénicas em vírus Influenza A, B ou C, sendo estes dois últimos menos graves para o Homem. O vírus influenza A está subdividido em subtipos, de acordo com a combinação entre as proteínas do envelope, hemaglutinina e neuraminidase. [29]

Este laboratório faz a confirmação da pesquisa feita pelo laboratório de Virologia, e utiliza, à sua semelhança, amostras de aspirado bronqueal ou exsudado nasal. Numa primeira fase, é feita a extração de RNA com recurso ao extrator NUCLISENS®easyMAG® da Biomérieux, que utiliza esferas de sílica magnéticas para a extração dos ácidos nucleicos e de seguida, procede-se a um RT-PCR em tempo real, cujos targets são o gene M (gene que codifica para a proteína M1 e M2) do vírus Influenza A e o gene NEP (gene que codifica a “Nuclear export protein”) do vírus Influenza B e gene da Rnase P, que funciona como controlo positivo para o processo de extração. [30]

Caso se obtenha um resultado positivo para vírus Influenza A, é feita a tipificação do vírus para distinguir entre vírus Influenza A (H1) e vírus Influenza A (H3), com recurso a outro Real-Time PCR, cujos targets são os genes das hemaglutininas H1 e H3. [31]

Pesquisa de Vírus da Dengue, Zyka e Chikungunya

Os vírus da Dengue, Zyka e Chikungunya são transmitidos pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti* e uma vez que apresentam uma sintomatologia semelhante, a sua pesquisa é feita em conjunto. Esta pesquisa é feita de forma célere, por forma a evitar um ciclo de transmissão, uma vez que pode também ser transmitido pelo mosquito *Aedes albopictus*, existente no território italiano. [32]

O vírus da Dengue apresenta quatro serotipos DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, sendo por isso, possível que uma pessoa seja infetada quatro vezes, já que a infeção por um serotipo gera apenas uma imunidade temporária e baixa contra os outros serotipos. Os principais sintomas desta infeção, aparecem normalmente ao fim de 15 dias de incubação e incluem dores musculares e nas articulações, febre alta e dor atrás dos olhos, contudo a doença pode evoluir e levar à morte. [33]

O vírus Chikungunya tem um período de incubação entre 4 a 7 dias e a infeção apresenta uma forma aguda que se caracteriza por dores musculares e articulares, febre alta

e erupções cutâneas, que pode evoluir para uma forma subaguda que se caracteriza pela persistência das dores articulares ou para uma forma crónica que se caracteriza pela persistência das dores articulares durante meses. [34]

O período de incubação do vírus Zyka ainda não é claro, mas sabe-se que não provoca quaisquer sintomas em 80% das pessoas infetadas, porém pode apresentar um quadro clínico semelhante aos vírus anteriores levando ainda ao aparecimento de vermelhidão e prurido no corpo. [35]

A pesquisa destes vírus é feita, utilizando amostras de urina, sangue, soro ou LCR e é feita com recurso a técnicas de biologia molecular, nomeadamente RT-PCR em tempo real, à exceção da dengue, para a qual se faz primeiro um teste serológico. [36]

Este teste serológico tem como base um ensaio imunoenzimático (EIA), com recurso ao SD BIOLINE Dengue Duo *kit*, que permite a deteção simultânea do antigénio NSI, uma glicoproteína presente em altas concentrações no soro, em fase aguda (1 a 5 dias) e dos anticorpos IgG e IgM contra a dengue, presentes numa fase mais tardia da infeção (5 a 14 dias). A amostra de soro, plasma ou sangue total é adicionada nos dois poços, sendo que no poço correspondente à deteção de anticorpos, são ainda, adicionadas 2 gotas de tampão, cedido com o *kit*. A amostra vai migrar em ambas as tiras e caso contenha os anticorpos contra o vírus dengue, estes vão-se ligar aos antigénios imobilizados na tira, produzindo uma banda rosada. No caso de a amostra conter antigénios NSI, estes ligar-se-ão aos anticorpos anti-NSI imobilizados na tira, produzindo também uma banda rosada. Um resultado positivo traduz-se no aparecimento de uma banda para NSI, aparecimento de uma banda IgM ou IgG, aparecimento das bandas NSI e IgM, simultaneamente ou aparecimento das bandas IgG e IgM, simultaneamente. Após um resultado positivo, é necessário fazer extração dos ácidos nucleicos, com recurso ao extrator NUCLISENS®easyMAG® da Biomérieux, para determinar qual o serotipo de dengue e para tal, faz-se um RT-PCR (Figura 10). [37]

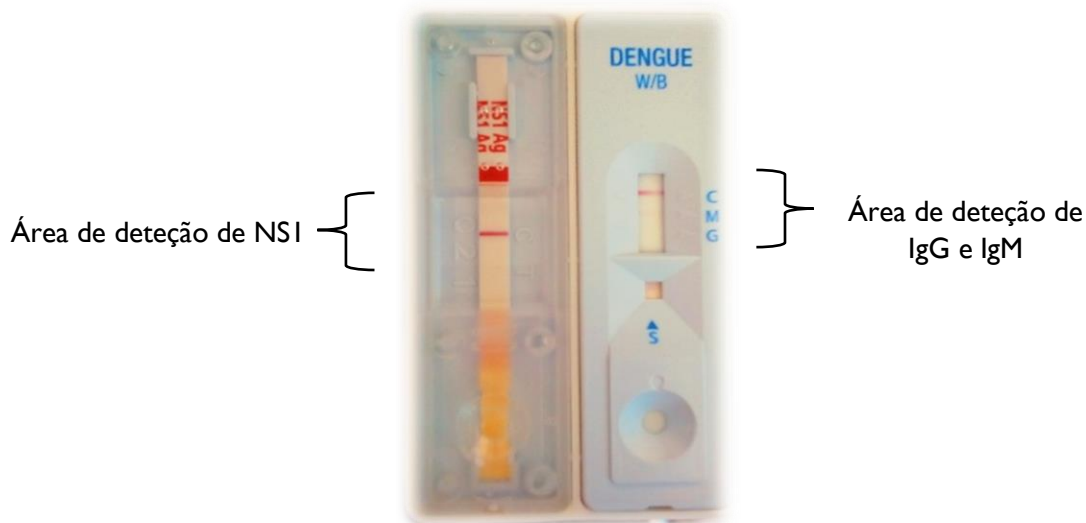


Figura 10- SD BIOLINE Dengue Duo kit

Pesquisa de vírus West-Nile

A febre do Nilo é uma doença causada pelo vírus West-Nile, que é transmitido através da picada de fêmeas de mosquito do género *Culex* e apresenta um período de incubação que varia entre os 3 e os 14 dias, não causando sintomas em 80% das pessoas infetadas. Os restantes 20% podem apresentar sintomas que variam entre anorexia, dor de cabeça, dor nos olhos e dores musculares ou em situações piores pode causar encefalites ou meningoencefalites graves. [38]

A pesquisa deste vírus é feita por meio de imunofluorescência indireta (IFI), um ensaio que permite detetar anticorpos específicos contra o vírus West-Nile. Este ensaio ocorre numa lâmina com diferentes poços, onde existem antígenos sob a forma de células infetadas, aos quais se vão ligar os anticorpos presentes na amostra de soro/plasma do utente. De seguida, adiciona-se um segundo anticorpo conjugado com fluoresceína, contra os anticorpos humanos. A fluoresceína é um fluoróforo que emite fluorescência verde, em microscopia de fluorescência, permitindo verificar a presença de anticorpos, através da presença desta fluorescência verde (Figura 11). [39] [40]

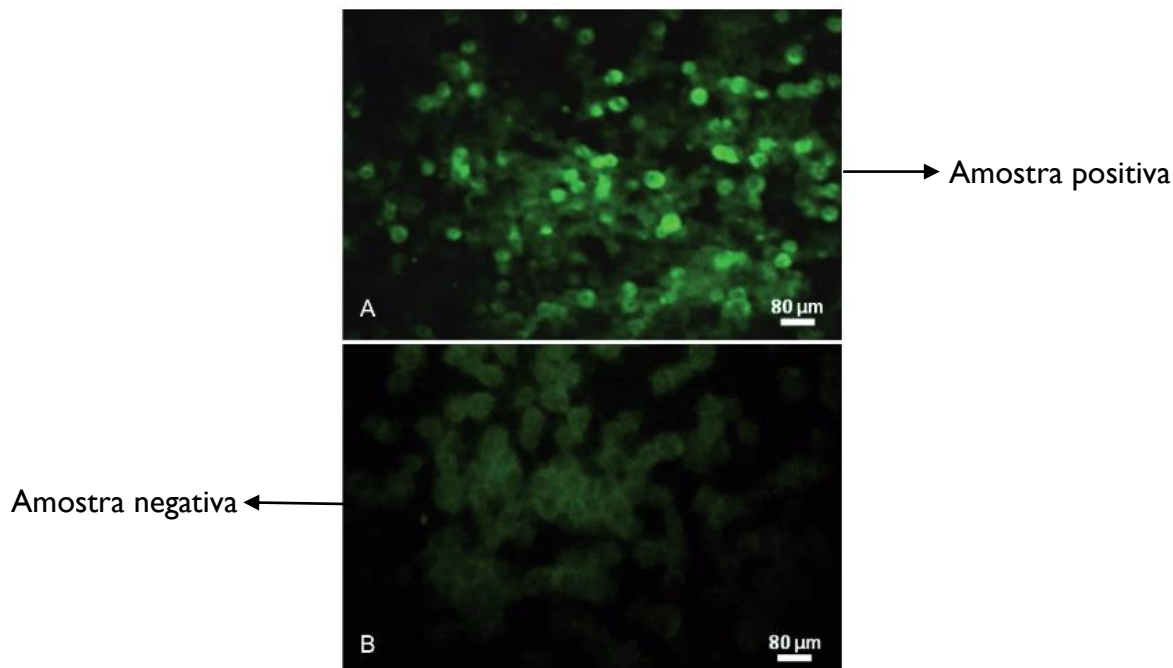


Figura 11- Visualização da fluorescência em amostras de WNV
Fonte: Martins, L. C. (2019)

Pesquisa do parasita da Malária

A malária é uma infecção endêmica em África, Ásia, América Central e América do Sul, causada por protozoários do género *Plasmodium* e que é transmitida pela picada da fêmea do mosquito do género *Anopheles*. Uma vez, na corrente sanguínea, o parasita dissemina-se, infectando e multiplicando-se nos eritrócitos e no fígado. Os sintomas da malária ocorrem entre 9 e 14 dias após a picada do mosquito e variam consoante a espécie de *Plasmodium* infectante, podendo incluir febre, dores de cabeça, calafrios, vômitos e anemia, devido à destruição dos eritrócitos. Apesar de ter cura, quando não tratada pode ter um desfecho fatal e daí ser extremamente importante a sua pesquisa através da visualização do parasita no sangue ao microscópio e de técnicas de imunologia e biologia molecular. [41]

A pesquisa começa com um teste imunocromatográfico, o BinaxNOW® Malaria test, que permite a deteção de antígenos de *Plasmodium*, nomeadamente a proteína enriquecida com histidina, (HRPII), específica de *Plasmodium falciparum* e a proteína pan-malária, comum a outras espécies, nomeadamente *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Para este teste, é necessário adicionar sangue e tampão no mesmo poço, no topo esquerdo do cartão. A interpretação dos resultados é feita com o cartão fechado e baseia-se no número de bandas

coradas de rosa que aparecem após os 15 minutos, sendo a presença da banda de controlo, sempre necessária. Se obtivermos uma banda T1, esta indica-nos a presença de antígeno (HRPII), do *P. falciparum*, caso obtenhamos uma banda T2, que indica a presença de proteína pan-malária, estamos perante *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*, ou perante uma infeção mista. No caso de obtermos ambas as bandas, T1 e T2, coradas, podemos estar perante uma infeção provocada por *P. falciparum* ou uma infeção mista (Figura 12). [42]



Figura 12- Teste rápido BinaxNow Malária

Contudo, estes resultados são sempre confirmados através da visualização microscópica do parasita num esfregaço de sangue periférico e através do método de "gota espessa". Para a realização do esfregaço de sangue, coloca-se uma gota de sangue numa das extremidades da lâmina de vidro e utilizando outra lâmina, faz-se contacto entre o seu bordo e a gota, num ângulo de 45°. A gota deve ser espalhada de forma uniforme, de forma a obter uma camada fina na sua superfície, permitindo a visualização do parasita de forma clara. Seguidamente, procede-se à fixação com metanol e por fim à coloração de Giemsa. No método de "gota espessa" é colocada uma gota de sangue no centro de uma lâmina de vidro e com outra lâmina, espalha-se a gota numa pequena área para que esta seja corada com coloração de Giemsa. Estes dois métodos permitem identificar a espécie do parasita, distinguir a sua morfologia e as diferentes formas parasitárias. [43]

Os resultados dos testes imunocromatográficos são confirmados através de métodos moleculares e para tal, é feita a extração de ácidos nucleicos de uma amostra de plasma do utente, com recurso ao extrator NUCLISENS®easyMAG® da Biomérieux. Caso o resultado

do teste imunocromatográfico seja positivo faz-se um PCR, cujo target é o gene 18S rRNA e caso se obtenha um resultado negativo no PCR, este é confirmado por uma reação de “Loop-mediated isothermal amplification” (LAMP), um método mais sensível. Este método é semelhante ao PCR, à exceção da fase da amplificação que decorre a uma temperatura constante e dispensa o uso de um termociclador. [44]

Setor de “Parassitologia”

Este laboratório colabora com o Comitê de Estudos de Parasitologia da Associação Italiana de Microbiologia Clínica na elaboração de diretrizes para infecções parasitárias, sendo membro do consórcio europeu LeishMan para a vigilância da leishmaniose humana na Europa. Este setor é responsável pelo estudo da infecção por *Leishmania* em utentes imunocompetentes e imunocomprometidos, estudo de protozoários do sangue e estudos epidemiológicos de parasitais intestinais e urogenitais em migrantes de Bologna.

O laboratório é responsável pela pesquisa de protozoários intestinais (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp*, *Entamoeba histolytica* e *Dientamoeba fragilis*) e helmintas intestinais (*Ascaris lumbricoides*, *Schistosoma spp*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichuris trichura*, *Ancylostoma duodenalis*, *Enterobius vermicularis*, etc.).

Diariamente, são processadas 40 a 60 amostras de fezes e/ou testes da fita-cola, traduzindo-se em 8000 amostras anuais, que são analisadas com recurso a microscopia ótica, testes imunológicos e imunocromatográficos, métodos de biologia molecular e culturas a partir de amostras fecais, no caso de *Strongyloides / Ancylostoma*.

Pesquisa de *Leishmania*

A leishmaníase é uma infecção causada por protozoários do género *Leishmania*, transmitidos por insetos dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo que existem mais de 20 espécies de *Leishmania*. Existem três tipos de leishmaníase: leishmaníase cutânea, leishmaníase mucocutânea e leishmaníase visceral, que diferem consoante a espécie infetante, resultando em sintomas que variam de acordo com o tipo de leishmaníase. Desta forma, a leishmaníase cutânea caracteriza-se pela presença de lesões no local da picada do inseto, na leishmaníase mucocutânea ocorre uma invasão das mucosas orais e nasais e da cartilagem, levando à sua

destruição. Por fim, na leishmaníase visceral há uma invasão do baço, fígado, medula óssea e órgãos linfoides, levando ao aparecimento de vários sintomas tais como, febre, caquexia, dores abdominais e leucopenia. [45] [46] [47]

O diagnóstico da infecção por este parasita começa com testes serológicos tais como o teste rápido TruQuick™ LEISH IgG/IgM 40T da Meridian Bioscience, imunoenensaio imunocromatográfico, que permite detetar anticorpos IgG e IgM contra *Leishmania donovani*, o principal responsável pela leishmaníase visceral. Este teste, em formato de cassete, apresenta uma membrana de nitrocelulose que contém uma banda controlo e duas bandas de teste (IgG e IgM). Para este teste, podem ser utilizadas amostras de sangue total, plasma ou soro, sendo este último, usado preferencialmente. São colocadas 40 µL de amostra no poço da cassete, seguidas de 2 gotas de tampão no mesmo poço e esperam-se 15 minutos pela leitura dos resultados. Para que o teste seja validado, é necessária a presença da banda controlo na cassete. Numa amostra que possua anticorpos IgG, estes irão ligar-se aos antigénios de *L. donovani* presentes na membrana de nitrocelulose, levando ao aparecimento de uma banda corada, na região IgG e caso a amostra possua anticorpos IgM, a cassete apresentará uma banda corada na região IgM. Pode ainda acontecer, que a amostra contenha os dois tipos de anticorpos e nesse caso, a cassete apresenta duas bandas coradas na região teste. [48]

Outro teste serológico utilizado, é a ELISA com recurso ao *kit* comercial LEISHMANIA ELISA IgG+IgM da Vircell Microbiologists, um imunoenensaio indireto que deteta a presença de anticorpos contra *Leishmania infantum* em amostras de soro ou plasma. Neste teste, é utilizada uma microplaca que se encontra revestida com antigénios, onde são adicionados 105 µL de amostra num poço. De seguida, a microplaca é incubada durante 45 minutos a 37°C, permitindo a ligação anticorpo-antigénio. Posteriormente, são feitas 5 lavagens, de forma a retirar os anticorpos que não se ligaram aos antigénios e é adicionado um segundo anticorpo conjugado a uma enzima, contra os anticorpos humanos. Procede-se a uma nova incubação, com uma duração de 30 minutos a uma temperatura de 37°C e posteriormente, a microplaca é lavada novamente 5 vezes. Adiciona-se o substrato da enzima, seguido de uma nova incubação durante 20 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Após os 20 minutos, é adicionada uma solução STOP e os resultados são medidos com recurso a um espectrofotómetro a dois comprimentos de onda, 450 e 630 nm. Através da densidade ótica é necessário calcular o índice de anticorpos, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de anticorpos} = \frac{\text{D.O amostra}}{\text{D.O média dos cut-off}}$$

Densidade ótica da amostra

Densidade ótica média dos cut-off

De acordo com os resultados obtidos, as amostras são classificadas em positivas se tiverem um valor de índice de anticorpos >11 e negativas, caso as amostras tenham um valor de índice de anticorpos <9 . [49] [50]

Para confirmar os resultados positivos dos testes serológicos, é feita uma extração de ácidos nucleicos com o instrumento NUCLISENS[®]easyMAG[®] da Biomérieux, de forma a ser possível a realização de um qPCR, cujo target é a sequência de codifica o cinetoplasto. [51]

Pesquisa de parasitas intestinais

A pesquisa de parasitas intestinais humanos compreende os protozoários (que incluem *Giardia intestinalis*, *Dientamoeba fragilis* (patogénio ocasional), *Blastocystis spp.* (patogénio ocasional), e menos comum: *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Isoospora belli*) e helmintas (que incluem *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia spp.*, e menos comum: *Diphyllobotrium latum*, *Schistosoma spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis minuta*). Para que a pesquisa seja o mais direcionada possível, é necessário ter em conta a sintomatologia do utente, quando possível acompanhada de dados laboratoriais e dados epidemiológicos de difusão do parasita. As infeções por parasitas intestinais podem levar a diferentes sintomas, todavia um quadro de diarreia, persistente ou recorrente, associada a má absorção, está associado geralmente a *Giardia intestinalis*, *Dientamoeba fragilis* e *Entamoeba histolytica*, a eosinofilia é associada a infeções por helmintas e o prurido anal é, normalmente, associado à presença de *Enterobius vermicularis*. É importante ter em consideração a imunocompetência do utente, pois em casos de imunodepressão, a sintomatologia agrava-se e pode mesmo ser letal. [52]

- **Exame parasitológico de fezes**

No caso de suspeita de infecção por protozoários intestinais, a pesquisa é realizada em material fecal coletado num recipiente com uma pá e para uma pesquisa mais correta é necessário analisar 3 amostras fecais recolhidas em dias alternados. O laboratório faz a validação macroscópica da amostra, isto é, as fezes são classificadas de acordo com sua consistência (fezes formadas, fezes pastosas, fezes diarreicas, fezes líquidas e fezes sanguinolentas) e verifica-se se esta classificação está de acordo com o exame pedido pelo médico. Ou seja, se o médico classificar a amostra como sendo fezes diarreicas e o laboratório verificar que a amostra recebida são fezes formadas, esta amostra é rejeitada e não é feita qualquer análise, evitando assim um possível erro de triagem. Faz-se ainda a deteção da presença de proglótides e/ou vermes adultos e assegura-se que o recipiente se encontra fechado e pronto para ser processado. [53]

Após esta avaliação, colocam-se 2 gotas de soluto de Lugol no centro da metade superior da lâmina e com a ajuda de uma ança de plástico coloca-se uma pequena porção da amostra no centro inferior da lâmina e mistura-se com o Lugol, preenchendo a lâmina. Coloca-se uma lamela e observa-se ao microscópio ótico com a ampliação de 20x. O soluto de Lugol cora o glicogénio e os núcleos dos quistos, permitindo uma melhor observação, mas inibe a mobilidade dos trofozoítos, não permitindo a observação dos movimentos dos parasitas. Em caso de dúvida na identificação pode-se fazer o exame a fresco, no qual o Lugol é substituído por água destilada. A observação ao microscópio deve percorrer todos os campos da lâmina e possibilita a observação de quistos, trofozoítos e os seres adultos, ovos e larvas de helmintas. [54]

No caso de helmintas, é necessário fazer a concentração das fezes e para tal utiliza-se o *kit* MIDI-SYSTEM PARAGREEN da Biolife, que fornece tubos de plástico que contém 10 mL de fixativo. Estes tubos possuem uma tampa superior com uma pá, com a qual se colhe uma porção de fezes do recipiente inicial (no caso de fezes líquidas, retirar 2 a 3 mL de amostra). De seguida, agita-se vigorosamente o tubo, durante 30 segundos e substitui-se a tampa inferior por um tubo de sedimentação. Centrifuga-se o tubo, durante 3 minutos a 2000 rpm, descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se o sedimento com 2 gotas de água destilada. Transferem-se 2 gotas para uma lâmina, utilizando uma pipeta de Pasteur, coloca-se a lamela e observa-se ao microscópio (Figura 13). [55]

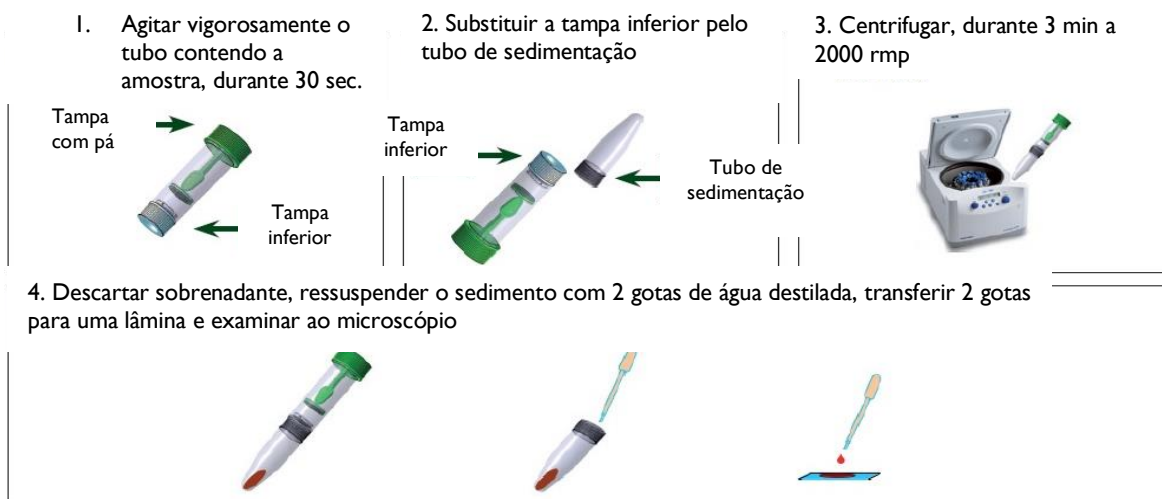


Figura 13- Processo de concentração de fezes

Adaptado da *Biolife* italiana

• Teste da fita-cola

O teste da fita-cola é realizado em situações de suspeita de oxiuríase, uma infecção causada por *Enterobius vermicularis*, um helminta que habita o intestino grosso e que está, normalmente, associado a prurido anal. As fêmeas adultas migram durante a noite e depositam os ovos na região perianal, sendo por esta razão que o teste da fita-cola é o mais aconselhado. Este teste consiste na recolha de ovos da região perianal, utilizando um pedaço de fita-cola, que é posteriormente colado, numa lâmina de vidro. Esta colheita deve ser feita de manhã, antes do banho e as mãos devem ser bem lavadas e desinfetadas com álcool, devido à grande possibilidade de contaminação (Figura 14). O teste da fita-cola é observado ao microscópio ótico a uma ampliação de 10x, percorrendo todos os campos da lâmina. Estes ovos apresentam características específicas, pois assemelham-se a “grãos de café”, possuem uma membrana dupla transparente e um dos lados é visivelmente achatado. [56] [57]

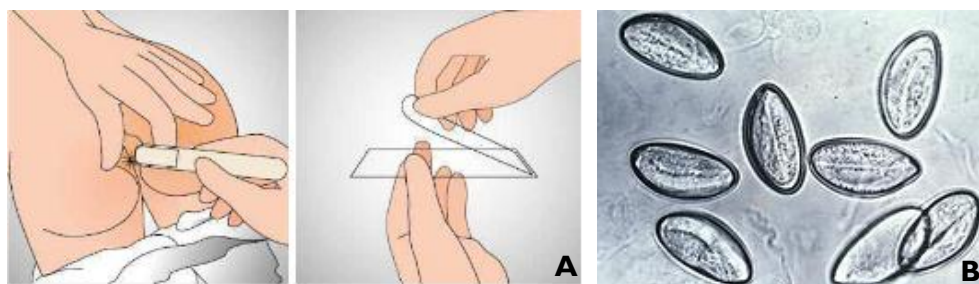


Figura 14- A: Teste de fita-cola; B: ovos de *E.vermicularis*

- **Teste rápido para *Giardia intestinalis* e *Cryptosporidium spp.***

O teste rápido para *Giardia intestinalis* e *Cryptosporidium spp.* é feito em situações em que exista uma suspeita de infecção por estes protozoários, permitindo assim, uma procura mais direcionada. É utilizado o teste imunocromatográfico Immunocard STAT![®] Crypto/Giardia da Meridian Bioscience, que permite a deteção de antígenos de *G. intestinalis* e *Cryptosporidium spp.*. Primeiro é necessário diluir uma pequena porção de fezes em água destilada e transferir 60 µL para um tubo de plástico fornecido com o kit. Neste mesmo tubo devemos colocar 2 gotas de tampão, 2 gotas de conjugado que possui anticorpos contra *G. intestinalis* e 2 gotas de conjugado que possui anticorpos contra *Cryptosporidium spp.*. De seguida, transfere-se toda a quantidade para o poço teste da cassete e aguardam-se 10 minutos para poder efetuar a leitura dos resultados. Se a amostra possuir antígenos de *G. intestinalis*, uma banda preta irá aparecer na zona GIAR, se amostra possuir antígenos de *Cryptosporidium spp.*, uma banda preta irá aparecer na região CRYP, nunca esquecendo, que a presença da banda controlo é exigida para validação do teste (Figura 15). [58]



Figura 15- Teste Immunocard STAT![®] Crypto/Giardia

III- Laboratório de “Oncologia e Ematologia”

O *Istituto di Ematologia "Seràgnoli"* é responsável pelo apoio ao diagnóstico e tratamento de doenças oncológicas e onco-hematológicas. Este instituto é acreditado pelo GITMO (Grupo Italiano de Transplante de Medula Óssea), sendo reconhecido como centro de excelência para o estudo e tratamento de doenças hematológicas. Este setor está sob a direção do Professor Michele Baccarani e um dos seus principais objetivos é o estudo laboratorial, assim como o estudo biológico e caracterização de doenças hematológicas.

Este setor é composto por um laboratório de Citogenética, um laboratório de Biologia Molecular, laboratório de Células Estaminais e Terapia Celular, laboratório de Criopreservação e Manipulação de Células Estaminais, um laboratório de Imunologia e Citofluorimetria e um laboratório de Hemocromocitometria e Química Clínica.

As doenças onco-hematológicas são doenças neoplásicas que por poderem ter diferentes alterações genéticas na sua génese necessitam de técnicas especializadas para as diagnosticar, uma vez que, estas alterações têm um enorme impacto no decurso da doença, assim como na resposta terapêutica, por parte do doente. Neste laboratório são utilizadas técnicas de citogenética convencional e/ou FISH, imunofenotipagem e biologia molecular.

No setor de Citogenética tive a possibilidade de integrar o trabalho prático e realizar técnicas especializadas, tais como o bandeamento de Giemsa em amostras de sangue periférico ou medula óssea, para o estudo do cariótipo, análise de cariótipos por citogenética convencional e/ou FISH, para deteção de diversas alterações cromossómicas, estruturais e/ou numéricas. No setor de Imunologia tive contacto com a técnica de citometria de fluxo, utilizada para identificação de neoplasias, mas também como monitorização de doentes aos 3, 6, 9 e 12 meses após o transplante de medula óssea. No setor de Biologia molecular, executei técnicas de separação leucocitária no sangue, como a técnica de “*Buffy-Coat*” e a Técnica de Ficoll-Paque, uma técnica de separação de células monucleares do sangue periférico, que inclui os linfócitos T, B, células NK e monócitos e que rejeita os granulócitos.

IV- Laboratório de Bioquímica

O departamento de Farmácia e Biotecnologia (FaBiT) da “Università degli Studi di Bologna” está sob a direção do Professor Santi Mario Spampinato e possui vários grupos que promovem a investigação na área da química e farmácia tecnológica, biomedicina, biotecnologia e biologia molecular.

O grupo de investigação de Bioquímica e Fisiologia Celular, Imagem Molecular e Biossensores é coordenado pelo Professor Stefano Iotti e pelo Professor Stefano Ferroni e desenvolve estudos relacionados com o metabolismo do magnésio e do papel dos canais iónicos e recetores transmembranares em diferentes processos fisiológico e fisiopatológicos, com recurso a espectroscopia de fluorescência, microscopia de raios X, biologia molecular e celular, microfluorimetria e eletrofisiologia.

A Professora Giovanna Farruggia, pertencente a este grupo, desenvolve com os seus alunos de licenciatura em Biotecnologia Farmacêutica, estudos do impacto da molécula de berberina em células de osteossarcoma (Saos), a nível do ciclo celular, potencial de membrana a nível da mitocôndria e formação de espécies de oxigénio reativas.

V- Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa

O Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa de Lisboa é um laboratório central composto por médicos patologistas clínicos, farmacêuticos e técnicos, formados nas diversas áreas da saúde. É composto por 10 laboratórios e 500 postos de colheita, sendo o responsável pela resposta laboratorial que apoia o diagnóstico de diversas doenças, como pela sua monitorização e prognóstico. Este laboratório dá resposta a diversas unidades hospitalares, atendendo, diariamente, cerca de 5500 utentes a nível nacional.

Setor de Imunologia, Immunopatologia e Autoimunidade e Imunoserologia

Este setor está sob a coordenação da Professora Doutora Maria José Rego de Sousa e é o setor responsável pelo estudo de doenças autoimunes e gamopatias monoclonais, apoiando o seu diagnóstico, assim como a monitorização da terapêutica destas patologias. Utiliza técnicas de eletroforese capilar para determinar o perfil eletroforético de proteínas, imunofixação/imunosubtração para o seu doseamento, técnicas de IFI e imunoensaio fluoroenzimático (FEIA). Na serologia, são utilizados imunoensaios, tais como ELISA que permitem a pesquisa de infeções.

Eletroforese de proteínas

O perfil eletroforético de proteínas séricas é determinado em amostras de soro, recorrendo ao instrumento automático CAPILLARYS 2 da SEBIA, que faz a separação das moléculas de acordo com a sua mobilidade eletroforética, por eletroforese capilar. A eletroforese capilar é uma técnica de separação em meio líquido, na qual cada amostra é diluída com tampão de diluição e injetada no capilar, que contém um tampão de separação. De seguida, é aplicada uma voltagem no capilar, gerando uma corrente elétrica no seu interior, o que vai gerar um fluxo eletrosmótico, permitindo a migração das proteínas do ânodo para o cátodo. Junto do cátodo existe um detetor que permite a identificação e quantificação de cada uma das frações de proteínas, de acordo com a sua absorvância a um comprimento de onda, na região do UV/ visível. [59]

Este procedimento é um *screening* e permite a separação de 6 frações distintas de proteínas séricas (Figura 16):

- Albumina;
- α 1 globulinas: α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína ácida, globulina ligadora de tiroxina (TBG) e α -fetoproteína;
- α 2 globulinas: α 2-macroglobulina, haptoglobulina e ceruloplasmina;
- β 1 globulinas: transferrina e ferritina;
- β 2 globulinas: proteínas C3 e C4;

- γ globulinas: imunoglobulinas e Proteína C-reativa.

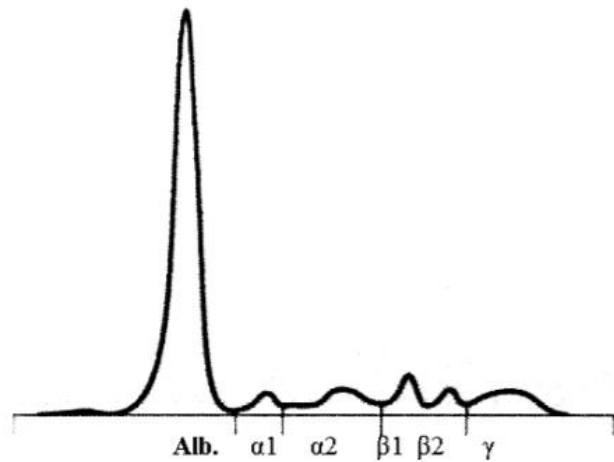


Figura 16- Perfil eletroforético de proteínas séricas normal

A análise do perfil eletroforético das proteínas é usada para identificar e quantificar as proteínas séricas, dando informações acerca da sua síntese e eliminação. Diversas doenças ou estados clínicos podem estar associados a uma alteração deste perfil eletroforético, como é o caso da gravidez, que leva à redução da fração da albumina ou a doença hepática grave que se traduz na redução da fração das $\alpha 1$ globulinas. Esta é a análise solicitada para identificar e monitorizar a produção de proteínas monoclonais, isto é a produção em excesso de uma determinada imunoglobulina, como é o caso do Mieloma Múltiplo. Nesta situação, é possível verificar através da análise da fração γ , a existência de um pico monoclonal nesta zona. [60]

- **Imunofixação por subtração**

A imunofixação por subtração permite detetar e identificar as componentes monoclonais em amostras de soro, utilizando o instrumento CAPILLARYS 2 da SEBIA e o kit CAPILLARYS IMMUNOTYPING, o qual contém anti-soros contra as cadeias pesadas IgG, IgA e IgM e cadeias leves κ e λ . As amostras são diluídas e posteriormente são expostas aos anti-soros, permitindo a sua ligação às imunoglobulinas. Após esta ligação, o instrumento faz nova eletroforese capilar das imunoglobulinas e deteta a diminuição do respetivo pico, tanto a nível das cadeias pesadas como a nível das cadeias leves, comparando-o com o perfil proteico de referência (ELP) (Figura 17). [61]

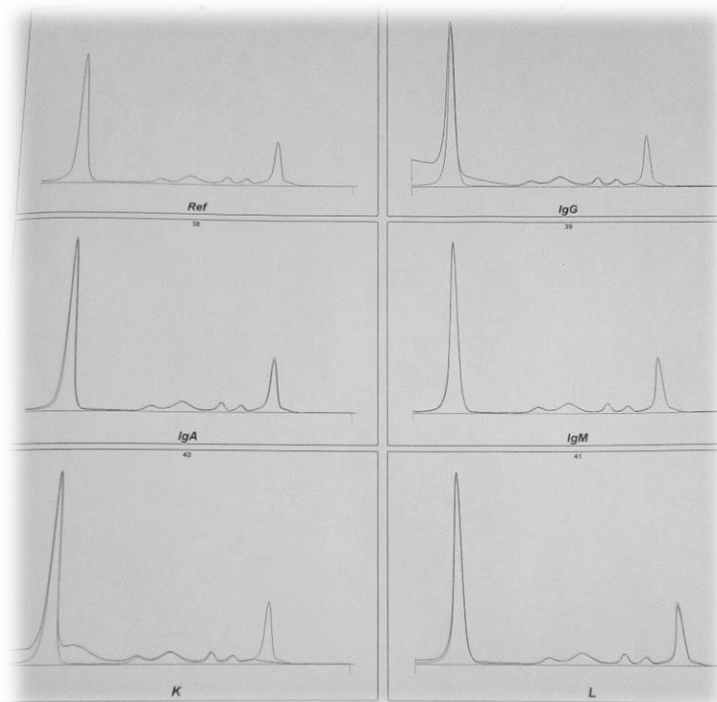


Figura 17- Resultado de uma análise, por imunosubtração, das proteínas séricas de um doente com uma Gamopatia monoclonal do tipo cadeias pesadas IgG e cadeias leves κ

- **Eletroimunofixação**

A caracterização do pico monoclonal da região γ no soro pode também ser feita através de eletroimunofixação (Figura 18) e é utilizada em situações em que imunofixação por subtração apresenta resultados inconclusivos. Neste caso, utiliza-se o *kit* HYDRAGEL IF e o instrumento HYDRASYS da SEBIA, que processa uma eletroforese das proteínas séricas, em gel de agarose. Este instrumento faz, de forma automatizada, a fixação, imunoprecipitação e incubação dos anti-soros (contra as cadeias pesadas IgG, IgA e IgM e as cadeias leves κ e λ) com as amostras. Os anti-soros irão ligar-se às imunoglobulinas, presentes no soro, levando à formação de complexos antígeno-anticorpo, que são corados com violeta-ácido, permitindo a sua deteção, macroscopicamente. [62]

No caso de amostras de urina esta é a técnica privilegiada, permitindo detetar e quantificar componentes monoclonais, nomeadamente a proteína de Bence-Jones, característica de doentes com Mieloma múltiplo. É feita uma eletroforese das proteínas da urina, colhida em 24 horas, em gel de agarose. Para tal, é utilizado o *kit* HYDRAGEL URINE PROFIL(E) e o instrumento HYDRASYS da SEBIA. Este instrumento faz a fixação,

imunoprecipitação e incubação dos anti-soros (contra as cadeias pesadas IgG, IgA e IgM e as cadeias leves κ e λ , livres e ligadas) com as amostras. Estes anti-soros irão ligar-se às imunoglobulinas presentes na urina, formando complexos antígeno-anticorpo, que são posteriormente corados com violeta-ácido, permitindo a visualização e identificação das bandas, comparando-as com o ELP. [63] [64]

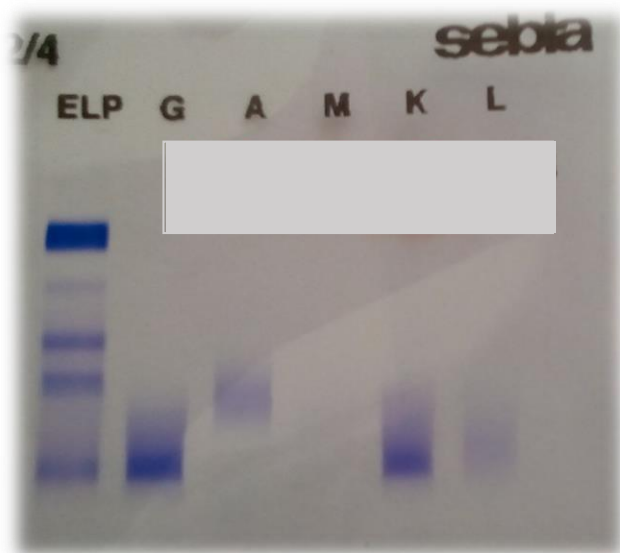


Figura 18- Resultado de uma análise, por imunofixação, das proteínas séricas de um doente com uma Gamopatia monoclonal do tipo cadeias pesadas IgG e cadeias leves κ

- **Pesquisa de bandas oligoclonais em LCR**

Uma grande concentração de proteínas no LCR pode indicar uma lesão na barreira hematoencefálica ou produção intratecal de imunoglobulinas, que se deteta pela presença de bandas oligoclonais, e que está normalmente associada a doentes com Esclerose Múltipla. [65]

Para a pesquisa de bandas oligoclonais, são necessárias uma amostra de soro e uma amostra de LCR, cuja colheita deve ser feita no mesmo dia. Em primeiro lugar, é realizado o doseamento de IgG, nas duas amostras pelo método nefelométrico, utilizando o instrumento BN ProSpec System da SIEMENS. Este método baseia-se na quantificação de luz dispersada, feita por um detetor que se encontra num ângulo de 90°C. Após este doseamento, diluem-se as amostras com um diluente do kit HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING da SEBIA, de forma a obter concentrações de IgG semelhantes, em ambas as amostras. De seguida, utilizando o instrumento HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING, ambas as amostras são submetidas a focagem

isoeletrica em gel de agarose que possui um gradiente de pH, no qual os componentes das amostras são separados de acordo com o seu ponto isoeletrico, isto é, param de migrar quando atingem o pH no qual têm carga nula. Após isto, é feita a imunofixação com um anti-soro corado para IgG, o que vai permitir a visualização das bandas. A presença de bandas IgG no LCR, que não se encontram no soro são indicação de produção de intratecal de imunoglobulinas. [66]

Ensaio fluoroenzimático (FEIA)

O ensaio fluoroenzimático (FEIA) é executado no equipamento Immunocap 250 da Thermo Scientific e é utilizado para apoiar o diagnóstico e avaliar doenças autoimunes, através da determinação quantitativa de anticorpos, no soro. Este ensaio utiliza poços revestidos com antígenos específicos para um determinado anticorpo, que caso esteja presente na amostra do utente irá ligar-se aos antígenos, formando um complexo antígeno-anticorpo. É adicionado um segundo anticorpo anti- imunoglobulina humana, conjugado com a enzima β - galactosidase, que se irá ligar a este complexo. Por fim, é adicionado o substrato da enzima, o 4-metilumbeliferil- β -D-galactosideo, que ao ser convertido origina um produto fluorescente, que é posteriormente lido por um fluorímetro. [67]

Este instrumento é responsável pela deteção dos seguintes anticorpos:

- **Anticorpos anti-transglutaminase tecidular e anti-Gliadina**

A transglutaminase tecidular é a enzima responsável pelo catabolismo das proteínas do glúten e os anticorpos anti-Transglutaminase tecidular (anti-tTG) são específicos da doença celíaca, que se traduz na intolerância ao glúten e que se manifesta pela inflamação crónica do intestino delgado. Os anticorpos IgA são mais específicos e menos sensíveis, enquanto os anticorpos IgG são mais sensíveis e menos específicos. Contudo, uma vez que existem doentes que apresentam uma deficiência de anticorpos IgA, é necessário fazer a quantificação de ambos os anticorpos para uma correta monitorização da doença. A gliadina é uma fração do glúten, que ao ser desaminada pela transglutaminase tecidular, estimula uma resposta imunitária nos doentes celíacos. Os anticorpos anti-Gliadina são anticorpos poucos específicos desta doença, mas são muito úteis na sua monitorização, já que os títulos de anticorpos descem rapidamente,

após a eliminação do glúten da dieta. São usados também, no apoio do diagnóstico em crianças com idade inferior a 2 anos, pois muitas vezes, estas não produzem anticorpos anti- tTG. [68]

- **Anticorpos anti-cardiolipina e anti- β 2-glicoproteína I**

A cardiolipina é um fosfolípido e por isso faz parte da constituição de todas as membranas celulares. A presença de anticorpos anti-cardiolipina pode ocorrer em situações de abortos espontâneos de repetição, Síndrome Antifosfolipídico (APS), Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e Tromboses Venosas ou Arteriais. A β 2-glicoproteína I é um cofator fosfolipídico, e os anticorpos contra esta glicoproteína, estão presentes em doentes com APS, sendo mais específicos que os anticorpos anti-cardiolipina. [69]

- **Anticorpos anti-CCP**

A modificação pós-traducional de proteínas que contenham aminoácidos de arginina pode levar à formação de resíduos de citrulina. A presença destes resíduos pode dar origem à formação de compostos cíclicos- péptidos citrulinados cíclicos. Por se apresentarem sob a forma cíclica, estes compostos apresentam o resíduo de citrulina exposto, permitindo a otimização da ligação a anticorpos. Por esta razão e por serem anticorpos muito específicos de doentes com Artrite Reumatóide (AR), a deteção de anticorpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) apoia o diagnóstico desta doença. Estes anticorpos podem aparecer antes do quadro clínico estar instalado, podendo serem detetados, numa fase mais precoce da doença. [70]

- **Anticorpos anti-dsDNA**

Os anticorpos anti-dsDNA são altamente específicos do Lúpus eritematosos sistémico (LES), uma doença autoimune, na qual ocorre destruição do tecido conjuntivo. Estes anticorpos estão presentes em 80 a 90% dos doentes com LES e os níveis de anticorpos estão relacionados com a atividade da doença. [71]

Imunofluorescência indireta (IFI)

A técnica de IFI é executada no equipamento Sprinter XL da EUROIMMUN, que é o responsável pela pipetagem automatizada das diferentes amostras, preparação das lâminas, lavagens e incubações. Neste ensaio a amostra é colocada sobre um determinado substrato que possui antigénios, aos quais se vão ligar os anticorpos presentes no soro do utente. De seguida, adiciona-se um segundo anticorpo conjugado com fluoresceína, específicos dos anticorpos humanos que vão permitir detetar a presença de anticorpos, através da presença de fluorescência verde. A intensidade e o padrão de fluorescência, observados ao microscópio de fluorescência, permitem oferecer um resultado qualitativo, isto é, positivo ou negativo ou semi-quantitativo, expresso em título. Esta técnica é utilizada para detetar autoanticorpos, os principais marcadores de doenças autoimunes e é utilizada para fazer o *screening* de deteção de anticorpos anti-nucleares (ANA). Os ANA reagem com vários constituintes nucleares, tais como ácidos nucleicos, proteínas do núcleo e ribossomas e caso se obtenha um resultado positivo quanto à sua presença, investiga-se a presença de outros autoanticorpos, utilizando outros substratos. [72]

Os anticorpos pesquisados neste setor são os seguintes:

- **Anticorpos anti-nucleares (ANA)**

O kit EUROPLUS ANA Mosaic 20A permite a deteção de mais de 30 padrões de fluorescência nucleares, citoplasmáticos e mitóticos (Tabela 1). Este mosaico consiste numa lâmina que possui células epiteliais humanas do carcinoma da laringe (HEp-2) e tecido de fígado de primata, o que permite a identificação dos ANA, através do seu padrão de fluorescência (Figura 19). A sua deteção é de extrema importância para o diagnóstico de diversas doenças autoimunes, das quais se destacam o Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), Doença Mista do Tecido Conjuntivo (MCTD), Artrite Reumatóide (AR), Síndrome de Sjögren (SS), Esclerodermia (ES) e Cirrose Biliar Primária (CBP). O substrato de Hep-2 permite identificar o padrão de fluorescência, mas a positividade destes anticorpos é estabelecida apenas pela fluorescência do tecido de fígado de primata. Um título a partir de 1:160 é considerado um resultado positivo e deve ser, sempre, integrado no contexto clínico de cada doente. [73]

Tabela 1- Padrões nucleares mais comuns

Padrão Nuclear	Antígenos associados	Doenças Associadas	Descrição
Homogêneo	dsDNA nucleossomas histonas	LES LES, induzido por drogas Artrite Idiopática Juvenil	Fluorescência homogênea e regular em todo o nucleoplasma. Mitoses positivas.
Fino Granular	SS-A/Ro SS-B/La Mi-2 Ku	Síndrome de Sjögren LES Dermatomiosite	Fluorescência granular de aspecto fino em todo o nucleoplasma. Mitoses negativas.
Membrana nuclear	Laminas A, B e C Proteínas associadas às laminas	Síndrome de Sjögren LES Artrites Seronegativas	Fluorescência homogênea com grande intensidade da membrana nuclear.
Centrómero	CENP-A/B	Esclerose Sistêmica forma cutânea limitada CBP	Pontos grosseiros individualizados nas células em interfase e concentrados na placa de cromatina nas células em mitose.
Nucleolar	PM/Scl-75 PM/Scl-100 Th/To	Esclerose Sistêmica Síndrome de Sobreposição Esclerose Sistêmica/Polimiosite	Fluorescência difusa em todo o nucléolo e ausência de fluorescência da placa metafásica.

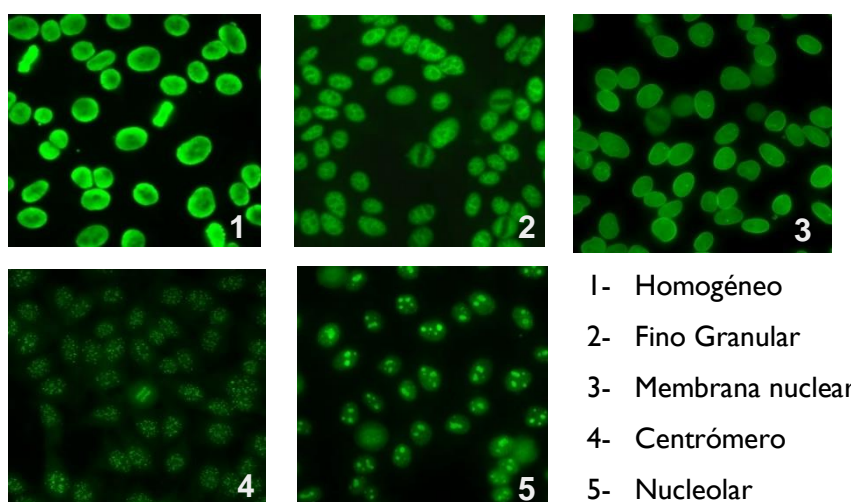


Figura 19- Padrões de Fluorescência Nuclear em células HEp-2

Fonte: "International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns (ICAP)"

A detecção de anticorpos anti-mitocôndria (AMA), anticorpos associados à CBP, pode também ser feita no substrato de HEP-2 e o seu padrão de fluorescência caracteriza-se por pontilhados concentrados na região perinuclear da célula e que se estendem em menor densidade para a região do citoesqueleto (Figura 20). [74]

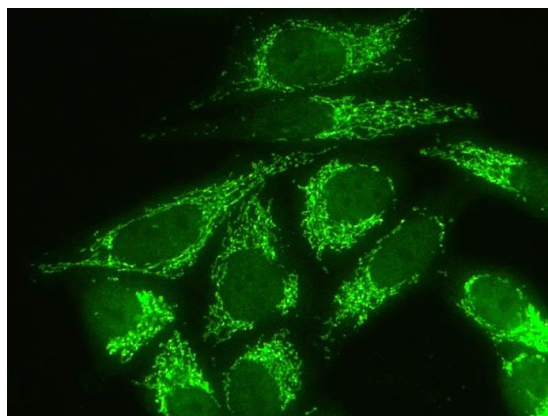


Figura 20- Padrão de fluorescência de AMA em células de HEP-2

Fonte: "International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns (ICAP)"

- **Anticorpos anti-dsDNA**

A positividade de anticorpos anti-dsDNA está normalmente associada a doentes com LES e a sua pesquisa é feita com recurso a células de *Crithidia lucilae*, protozoários flagelados que possuem um cinetoplasto. Esta estrutura contém DNA que não se encontra associado a histonas e os anticorpos que reagem com este organelo são anticorpos anti-dsDNA (Figura 21). [75]

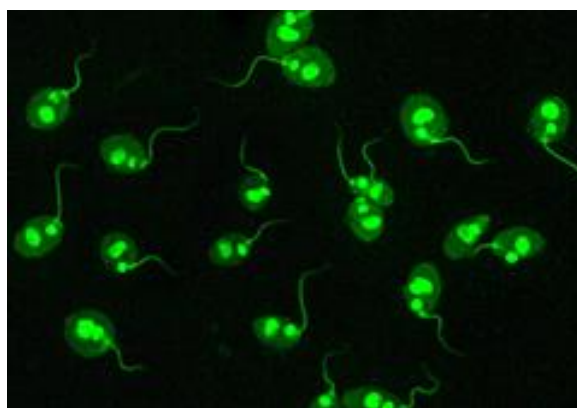


Figura 21- Padrão de Fluorescência de anticorpos anti-dsDNA

Fonte: Euroimmun

- **Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)**

Os ANCA são anticorpos contra enzimas existentes no citoplasma dos neutrófilos, constituindo importantes marcadores nas glomerulonefrites progressivas e vasculites (Granulomatose de Wegener, poliangeíte microscópica e Síndrome de Churg-Strauss). A sua identificação é feita com recurso ao *kit* EUROPLUS Granulocyte Mosaic 25, que combina vários substratos. Possui substratos de neutrófilos, de enzimas mieloperoxidase (MO), proteinase 3 (PR3), HEp-2 + neutrófilos e membrana glomerular basal (GBM). A deteção de ANCA é feita, utilizando substratos de neutrófilos fixados com etanol, o que permite diferenciar dois padrões de fluorescência diferentes:

- Padrão citoplasmático (cANCA): presença de fluorescência granular homogénea no citoplasma dos neutrófilos e os núcleos sem fluorescência;
- Padrão perinuclear (pANCA): presença de fluorescência fina granular que rodeia os núcleos dos neutrófilos (Figura 22).

Os substratos que contêm as enzimas permitem uma identificação mais específica do antígeno alvo dos ANCA. No Síndrome de Churg-Strauss, os pANCA estão normalmente associados à MPO, mas este padrão de fluorescência pode estar associado a outros enzimas como a elastase ou a lisozima, enquanto na Granulomatose de Wegener, os cANCA estão quase sempre associados à PR3. Padrões de fluorescência, atípicos, de ANCA podem estar associados a outras doenças inflamatórias, tais como as glomerulonefrites, na qual os doentes produzem anticorpos contra a GBM. Alguns padrões de fluorescência de ANA podem ser semelhantes aos padrões perinucleares de ANCA e por esta razão é utilizado o substrato de HEp-2 + neutrófilos. No caso de um resultado positivo de ANA, todos os núcleos das células HEp-2 emitem fluorescência, enquanto que no caso de ANCA apenas os granulócitos emitem fluorescência. [76]

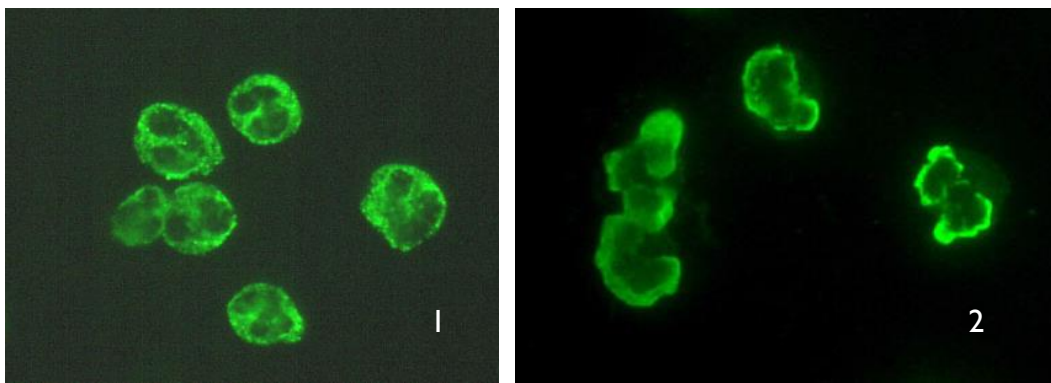


Figura 22- Padrões de Fluorescência de cANCA (1) e pANCA (2)

Fonte: "Liver Antibodies" (University of Birmingham)

- **Anticorpos anti-mitocôndria (AMA)**

A detecção dos AMA é realizada, utilizando o *kit* Liver Mosaic 8, constituído por 6 substratos: HEP-2, fígado de primata, rim de rato, fígado de rato, estômago de rato e células provenientes da aorta torácica de embrião de rato (VSM47). A positividade destes anticorpos é caracterizada por uma fluorescência citoplasmática granular em todos os substratos. [77]

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

Os ASMA estão normalmente associados a Hepatites Autoimunes tipo I e III e são normalmente anticorpos contra a actina, sendo a sua detecção feita utilizando o *kit* Liver Mosaic 8. Os ASMA contra a F-actina reagem com o citoesqueleto das HEP-2, apresentando fluorescência, a nível desta estrutura (Figura 23-1) e no substrato de fígado de primata ocorre fluorescência a nível dos canalículos biliares (Figura 23-2). Em todos os órgãos, o estrato muscular das artérias emite fluorescência (Figura 23-3) e no substrato de fígado ocorre fluorescência a nível da veia porta (Figura 23-4). Apresentam também fluorescência a nível da túnica muscular, mucosa da lâmina muscular e fibrilhas contráteis interglandulares no substrato de estômago de rato (Figura 23-5). O substrato VSM47 reage muito especificamente, apresentando uma fluorescência filamentosa tipo agulha, a nível do citoesqueleto (Figura 23-6). [78]

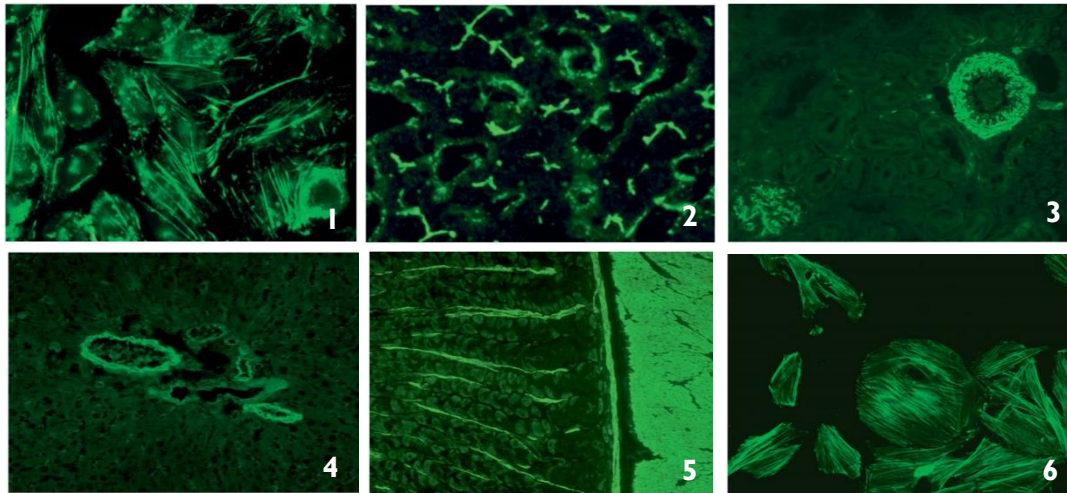


Figura 23- Padrão de Fluorescência de ASMA a nível das HEp-2 (1), fígado de primata (2), rim de rato (3), fígado de rato (4), estômago de rato (5) e VSM47 (6)

Fonte: Euroimmun

- **Anticorpos anti-microsossomais do fígado e rim (anti-LKM)**

Os anticorpos anti-microsossomais do fígado e do rim (anti-LKM) são anticorpos contra o citocromo P450, um grupo de enzimas que são encontradas, principalmente no fígado. Estes anticorpos estão, normalmente, presentes em doentes com Hepatite Autoimune tipo II e a sua deteção é feita utilizando o *kit* Liver Mosaic I, apresentando fluorescência suave no citoplasma dos hepatócitos a nível do fígado de rato e uma fluorescência granular a nível dos túbulos proximais no substrato de rim de rato (Figura 24). [79]

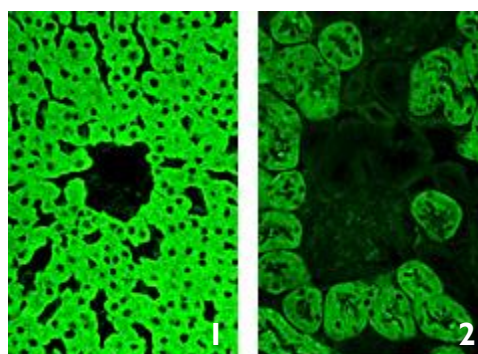


Figura 24- Padrão de Fluorescência de anti-LKM a nível do fígado (1) e do rim de rato (2)

Fonte: Euroimmun

- **Anticorpos anti-célula parietal (PCA)**

Os anticorpos anti-célula parietal (PCA) estão associados à anemia perniciosa e sua detecção é feita em substratos de estômago de primata. Um resultado positivo consiste na observação de fluorescência granular irregular, a nível do citoplasma das células parietais, e áreas circundantes escuras. Contudo, por produzirem padrões de fluorescência semelhantes aos AMA, os substratos devem ser, primeiro, tratados com um tampão de ureia-glicina durante 30 minutos. A ureia vai suprimir a fluorescência dos AMA, garantindo ao observador que a fluorescência observada é referente exclusivamente aos PCA, evitando resultados falsos positivos (Figura 25). [80]

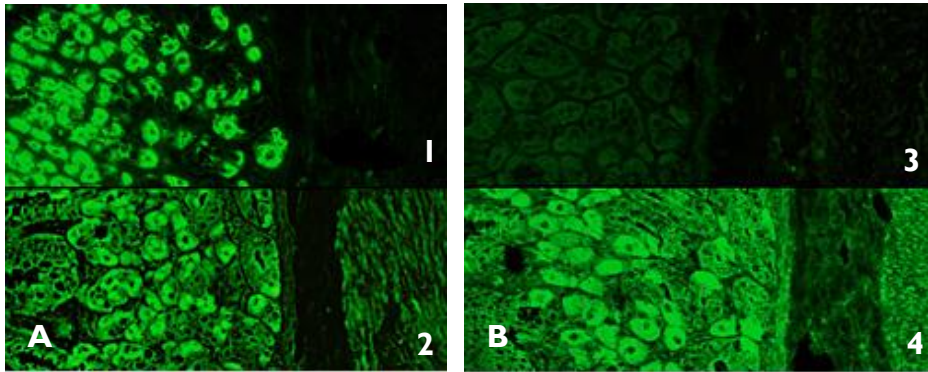


Figura 25- A: Padrão de Fluorescência de PCA em substrato de estômago de primata com tratamento de ureia (1) e sem tratamento de ureia (2); B: Padrão de Fluorescência de AMA em substrato de estômago de primata com tratamento de ureia (3) e sem tratamento de ureia (4).

Fonte: Euroimmun

Setor de Hematologia e Hemostase

Este setor está sob a coordenação da Dra. Marta Prata e é o responsável pelo identificação e monitorização de doenças hematológicas a nível dos eritrócitos (anemias e hemoglobinopatias), leucócitos e plaquetas (alterações quantitativas e qualitativas e alterações da coagulação).

Neste setor, acompanhei toda a rotina laboratorial, nomeadamente o processamento de hemogramas, determinação das velocidades de sedimentação, avaliação de hemoglobinopatias, com recurso a eletroforese capilar, determinação de grupos sanguíneos, doseamento da hemoglobina glicada e exames laboratoriais para avaliação da hemóstase. Para além disso, fiz esfregaços sanguíneos, colorações de medulas ósseas e posterior observação microscópica. Participei ativamente na validação técnica de resultados e na execução dos controlos diários dos equipamentos, de forma autónoma. Acompanhei a validação biopatológica dos resultados, o que permitiu o contacto com diversas situações clínicas, como anemias, neoplasias, hemoglobinopatias e doentes com deficiências na coagulação. Tive ainda a oportunidade de assistir a uma auditoria interna e de ter participado no processamento de amostras de controlo externo de qualidade, do programa UK NEQAS.

VI- Conclusão

A experiência num hospital público de referência e num laboratório privado, permitiu constatar as diferenças, tanto a nível de volume de trabalho como a nível de metodologias usadas. Este estágio permitiu o contacto com diversos profissionais da área, tais como médicos, biólogos e técnicos de análises clínicas. Tive oportunidade de trabalhar com uma grande diversidade de técnicas especializadas, laboratórios de biossegurança de nível 3, equipas de trabalho e de investigação das diferentes áreas.

Apesar de todos os problemas burocráticos e da impossibilidade de fazer a rotação laboratorial, em Itália, como tinha sido acordada, a experiência de estágio e de Erasmus revelou-se extremamente enriquecedora. A área da Microbiologia foi bastante explorada, o que permitiu o contacto com diversas técnicas laboratoriais e diversos agentes patogénicos, nomeadamente, vírus, bactérias e parasitas. Na área de hematologia e oncologia, tive contacto com técnicas especializadas, nomeadamente citogenética convencional e FISH, citometria de fluxo, e técnicas de separação de glóbulos brancos do sangue total. A área da bioquímica, no âmbito de investigação científica, permitiu o manuseamento de culturas celulares e tratamento de dados com citómetro de fluxo.

O Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa permitiu-me completar o meu estágio, nas áreas de Hematologia e Imunologia, permitindo a aquisição de diversos conhecimentos e uma melhor preparação profissional. A área da hematologia foi bastante explorada, tendo um forte acompanhamento por parte dos técnicos e médicos patologistas, tanto a nível da validação técnica como a nível da validação biopatológica. Tive ainda oportunidade de presenciar auditorias internas e de executar os controlos externos de qualidade, o que permitiu maior contacto com a área de gestão de qualidade.

Na área de imunologia, executei, as diversas técnicas especializadas, o que permitiu a aquisição de novos conhecimentos na área da autoimunidade. Para além da execução das técnicas, acompanhei a observação microscópica de fluorescência e a validação biopatológica dos resultados.

Com este estágio, tive o contacto com diversas equipas de trabalho e vários profissionais das diferentes áreas, que me proporcionaram um estágio diversificado e de qualidade.

Bibliografia

- 1 COSGUN, Yasemin *et al.* - The importance of serological and molecular analyses for the diagnosis of measles cases and for meeting elimination targets in Turkey from 2007 to 2015. *Epidemiology and Infection*. 146 (2018) 735–740.
- 2 SIDOTI, Francesca *et al.* - Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 9 (2015) 551–561.
- 3 PARSONS, Brendon D. *et al.* - Detection, Characterization, and Typing of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 7 (2016) 478.
- 4 MARTIN, Jessica S. H.; MONAGHAN, Tanya M.; WILCOX, Mark H. - *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 13:4 (2016) 206–216.
- 5 SCANSEN, Kimberly A. *et al.* - Comparison of Polyurethane Foam to Nylon Flocked Swabs for Collection of Secretions from the Anterior Nares in Performance of a Rapid Influenza Virus Antigen Test in a Pediatric Emergency Department. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (2010) 852–856.
- 6 DAS, Shubhagata; DUNBAR, Sherry; TANG, Yi Wei - Laboratory diagnosis of respiratory tract infections in children - The state of the art. *Frontiers in Microbiology*. 9 (2018) 2478.
- 7 XIONG, Shengwen *et al.* - A Helical Short-Peptide Fusion Inhibitor with Highly Potent Activity against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1), HIV-2, and Simian Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*. 91 (2017) e01839–01816.
- 8 SAMPATHKUMAR, Raghavan *et al.* - HIV-1 Subtypes and 5'LTR-Leader Sequence Variants Correlate with Seroconversion Status in Pumwani Sex Worker Cohort. *Viruses*. 10 (2017) 4.
- 9 RAMOS, Eric M. *et al.* - Performance of an alternative HIV diagnostic algorithm using the ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo assay and potential utility of sample-to-cutoff ratio to discriminate primary from established infection. *Journal of Clinical Virology*. 58 (2013) e38–e43.
- 10 KEATING, Sheila M. *et al.* - Performance of the Bio-Rad Geenius HIV1/2 Supplemental Assay in Detecting “Recent” HIV Infection and Calculating Population Incidence. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 73 (2016) 581–588.
- 11 MOON, Hee-Won *et al.* - Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV 1/2 Confirmation Assay as an Alternative to Western Blot in the Korean Population: A Multi-Center Study. *PLOS ONE*. 10 (2015) e0139169.

- 12 TANG, Ning *et al.* - A RealTime HIV-I viral load assay for automated quantitation of HIV-I RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples. *Journal of Virological Methods*. 146 (2007) 236–245.
- 13 READ, J. S. - Diagnosis of HIV-I Infection in Children Younger Than 18 Months in the United States. *PEDIATRICS*. 120 (2007) e1547–e1562.
- 14 CHAWLA, A. *et al.* - Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antibody Avidity Testing To Identify Recent Infection in Newly Diagnosed HIV Type I (HIV-I)-Seropositive Persons Infected with Diverse HIV-I Subtypes. *Journal of clinical microbiology*. 45 (2007) 415–420.
- 15 RHEE, Soo-Yon *et al.* - HIV-I Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Variation. *Journal of Virology*. 90 (2016) 6058–6070.
- 16 SALADINI, Francesco *et al.* - Agreement between an in-house replication competent and a reference replication defective recombinant virus assay for measuring phenotypic resistance to HIV-I protease, reverse transcriptase, and integrase inhibitors. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 32 (2018) e22206.
- 17 MURRAY, Patrick., ROSENTHAL, Ken & PFALLER, Michael – *Medical Microbiology*. 8^a Ed., Canada, Elsevier, 2015. ISBN 9780323299565
- 18 VLASIC-MATAS, Jadranka *et al.* - Prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Chlamydia trachomatis* in patients with uncomplicated recurrent urinary tract infections. *Nephrology and Renal Diseases*. 4 (2019) 1–4.
- 19 FOUZIA, Radouani *et al.* -Urogenital *Mycoplasma* in Moroccan Population: Prevalence and Antibiotic Susceptibility. *International Journal of Science and Technology*. 3 (2014) 415–421.
- 20 GALÁN, Jorge E. - Typhoid toxin provides a window into typhoid fever and the biology of *Salmonella Typhi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113 (2016) 6338–6344.
- 21 LEUNG, Daniel T. *et al.* - Factors Associated with Encephalopathy in Patients with *Salmonella enterica* Serotype Typhi Bacteremia Presenting to a Diarrheal Hospital in Dhaka, Bangladesh. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 86 (2012) 698–702.
- 22 ADHIKARI, Anurag *et al.* - Evaluation of sensitivity and specificity of ELISA against Widal test for typhoid diagnosis in endemic population of Kathmandu. *BMC Infectious Diseases*. 15 (2015) 523.
- 23 NONATO, Solange Maria; MELO, Ana Paula Souto; GUIMARÃES, Mark Drew Crosland - *Sífilis na gestação e fatores associados à sífilis congênita em Belo Horizonte-MG, 2010-*

2013. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 24 (2016) 681–694.
- 24 MORSHED, Muhammad G.; SINGH, Ameeta E. - Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 22 (2015) 137–147.
- 25 MARKS, Michael *et al.* - Metaanalysis of the Performance of a Combined Treponemal and Nontreponemal Rapid Diagnostic Test for Syphilis and Yaws. *Clinical Infectious Diseases*. 63 (2016) 627–633.
- 26 MOHD HANAFIAH, Khayriyyah *et al.* - Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 57 (2013) 1333–1342.
- 27 CHANTRATITA, Wasun *et al.* - 6 HCV genotyping 9G test and its comparison with VERSANT HCV genotype 2.0 assay (LiPA) for the hepatitis C virus genotyping. *Journal of Virological Methods*. 239 (2017) 1–8.
- 28 AMINI, Ali *et al.* - Diagnostic accuracy of tests to detect hepatitis B surface antigen: a systematic review of the literature and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*. 17 (2017) 19–37.
- 29 HOUSER, Katherine; SUBBARAO, Kanta - Influenza Vaccines: Challenges and Solutions. *Cell Host & Microbe*. 17 (2015) 295–300.
- 30 KOUTSAKOS, Marios *et al.* - Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiology*. 11 (2016) 119–135.
- 31 MARCOS, Pool *et al.* - Detección de virus influenza A, B y subtipos A (H1N1) pdm09, A (H3N2) por múltiple RT-PCR en muestras clínicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 34 (2017) 192.
- 32 AKINER, Mustafa M. *et al.* - Arboviral screening of invasive Aedes species in northeastern Turkey: West Nile virus circulation and detection of insect-only viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13 (2019) e0007334.
- 33 CLAIN *et al.* - The Polyphenol-Rich Extract from *Psiloxylon mauritianum*, an Endemic Medicinal Plant from Reunion Island, Inhibits the Early Stages of Dengue and Zika Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (2019) 1860.
- 34 KIM *et al.* - Development of an E2 ELISA Methodology to Assess Chikungunya Seroprevalence in Patients from an Endemic Region of Mexico. *Viruses*. 11 (2019) 407.
- 35 PAWLEY, Devon C. *et al.* - Highly Sensitive and Selective Direct Detection of Zika Virus Particles in Human Bodily Fluids for Accurate Early Diagnosis of Infection. *ACS Omega*. 4 (2019) 6808–6818.
- 36 VIEIRA, Marcelo Adriano Da Cunha E. Silva *et al.* - Potential role of dengue virus,

- chikungunya virus and Zika virus in neurological diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 113 (2018) 1–6.
- 37 PALOMARES-REYES, Carlos *et al.* - Dengue diagnosis in an endemic area of Peru: Clinical characteristics and positive frequencies by RT-PCR and serology for NSI, IgM, and IgG. *International Journal of Infectious Diseases*. 81 (2019) 31–37.
- 38 MOURA-NETO, José A. *et al.* - Emergent Arboviruses and Renal Transplantation: A Global Challenge. *Kidney International Reports*. 4 (2019) 647–655.
- 39 LI, Wei *et al.* - West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system. *Scientific Reports*. 7 (2017) 3286.
- 40 MARTINS, Livia Caricio *et al.* - First isolation of West Nile virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 114 (2019) e180332.
- 41 COWMAN, Alan F. *et al.* - Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 167 (2016) 610–624.
- 42 MATHISON, Blaine A.; PRITT, Bobbi S. - Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *Journal of Clinical Microbiology*. (2017) 2009–2017.
- 43 ROSADO, Luís *et al.* - Mobile-based analysis of malaria-infected thin blood smears: Automated species and life cycle stage determination. *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017) 1–22.
- 44 HASHIMOTO, Muneaki *et al.* - In situ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of Plasmodium species in wide-range thin blood smears. *Malaria Journal*. 17 (2018) 235.
- 45 RODRIGUES, Vasco *et al.* - Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites and Vectors*. 9 (2016) 1–13.
- 46 ROHOŠOVÁ, Iva *et al.* - Serological Evaluation of Cutaneous Leishmania tropica Infection in Northern Israel. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 98 (2018) 139–141.
- 47 SAVOIA, Dianella - Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*. 9 (2015) 588–596.
- 48 FREIRE, Mariana Lourenço *et al.* - Evaluation of a new brand of immunochromatographic test for visceral leishmaniasis in Brazil made available from 2018. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 60 (2018) e49.
- 49 HERRILLO, L. *et al.* - Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). *Clinical Microbiology and Infection*. 21 (2015) 269–273.
- 50 ROSTAMIAN, Mosayeb *et al.* - Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are

- associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 50 (2015). 160–166.
- 51 GALLUZZI, Luca *et al.* - Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 11 (2018) 1–13.
- 52 GARCIA, Lynne S. *et al.* - Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clinical Microbiology Reviews*. 31 (2018) e00025–17.
- 53 KOTGIRE, Santosh - Microbiological Stool Examination : Overview Microbiological Stool Examination : Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 6 (2012) 503-509.
- 54 HASSEN AMER, Omar; ASHANKYTY, Ibraheem M.; HAOUAS, Najoua Al Sadok - Prevalence of intestinal parasite infections among patients in local public hospitals of Hail, Northwestern Saudi Arabia. *Journal of Tropical Medicine* 9 (2016) 44–48.
- 55 GARCIA, Lynne S. *et al.* - Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clinical Microbiology Reviews*. 31 (2018) 1–81.
- 56 HONG, S. H. *et al.* Prevalence of *Enterobius vermicularis* among preschool children in Muan-gun, Jeollanam-do, Korea. *The Korean journal of parasitology*. 50 (2012) 259–262.
- 57 FAN, Chia-Kwung *et al.* - *Enterobius vermicularis* infection: prevalence and risk factors among preschool children in kindergarten in the capital area, Republic of the Marshall Islands. *BMC Infectious Diseases*. 19 (2019) 46–50.
- 58 BOUYOU-AKOTET, M. K. *et al.* - Low sensitivity of the ImmunocardSTAT® Crypto/Giardia Rapid Assay test for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal samples from children living in Libreville, Central Africa. *Journal of Parasitic Diseases* 40 (2016). 1179–1183.
- 59 SPUDEIT, Daniel Alfonso; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu - Conceitos básicos em eletroforese capilar. *Scientia Chromatographica*. 4 (2012) 287–297.
- 60 LOPES, Aline De Freitas; MALENA, Rosa; FARIA, Delbone De - Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*. 18 (2008) 116–122.
- 61 DAHRAOUI, Souhail *et al.* - Unexpected discovery of multiple myeloma following cardiomyopathy. *Clinical Case Reports*. 6 (2018) 86–90.
- 62 RAJ, Shailaja *et al.* - Paraproteinemia and serum protein electrophoresis interpretation. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 122 (2019) 11–16.
- 63 MISRA, Aroonima *et al.* - Old but Still Relevant: High Resolution Electrophoresis and Immunofixation in Multiple Myeloma. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 32 (2016) 10–17

- 64 YANG, Zhaohai *et al.* - Performance of the Sebia CAPILLARYS 2 for Detection and Immunotyping of Serum Monoclonal Paraproteins. *Immunopathology* 128 (2007) 293–299.
- 65 FARINA, Gabriele *et al.* - Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: a combined CSF and MRI study. *Journal of Neuroinflammation*. 14 (2017) 1–11.
- 66 PRANZATELLI, Michael R.; MCGEE, Nathan R.; TATE, Elizabeth D. - Relation of intrathecal oligoclonal band production to inflammatory mediator and immunotherapy response in 208 children with OMS. *Journal of Neuroimmunology* 321 (2018) 150–156.
- 67 TOORENENBERGEN, Albert W. VAN - Between-laboratory quality control of automated analysis of IgG antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 74 (2012) 278–281.
- 68 LERNER, Aaron *et al.* - Antibodies against neo-epitope tTg complexed to gliadin are different and more reliable than anti-tTg for the diagnosis of pediatric celiac disease. *Journal of Immunological Methods* 429 (2016) 15–20.
- 69 EL-ASSAAD, Fatima *et al.* - Posttranslational forms of beta 2-glycoprotein I in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis Journal*. 14 (2016) 159–163.
- 70 WAGNER, C. A. *et al.* - Identification of anticitrullinated protein antibody reactivities in a subset of anti-CCP-negative rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1 «shared epitope» alleles. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 74 (2015) 579–586.
- 71 REKVIG, O. P. - Anti-dsDNA antibodies as a classification criterion and a diagnostic marker for systemic lupus erythematosus: critical remarks. *Clinical and Experimental Immunology*. 179 (2015) 5–10.
- 72 SHOVMAN, O. *et al.* - A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Immunologic Research*. 61 (2014) 135–140.
- 73 BEERS, Joyce J. B. C. VAN *et al.* - Performance analysis of automated evaluation of antinuclear antibody indirect immunofluorescent tests in a routine setting. *Autoimmunity Highlights*. 9 (2018) 1–7.
- 74 INFANTINO, M. *et al.* - The burden of the variability introduced by the HEp-2 assay kit and the CAD system in ANA indirect immunofluorescence test. *Immunologic Research*. 65 (2017) 345–354
- 75 BUZZULINI, Francesca *et al.* - The classification of *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (CLIFT) using a novel automated system. *Arthritis Research and Therapy*. 16 (2014)

2–7.

- 76 RAO, Deepak A. *et al.* - Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies (mpo-anca) and proteinase 3-anca without immunofluorescent ANCA found by routine clinical testing. *Journal of Rheumatology*. 42 (2015) 847–852.
- 77 LISO, Federica De *et al.* - The diagnostic accuracy of biomarkers for diagnosis of primary biliary cholangitis (PBC) in anti-mitochondrial antibody (AMA)-negative PBC patients: A review of literature. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 56 (2017) 25–31.
- 78 LYTTON, Simon D. *et al.* - Tryptophan-kynurenine profile in pediatric autoimmune hepatitis. *Immunologic Research*. 67 (2019) 39–47.
- 79 TERZIROLI, Benedetta; MIELI-VERGANI, Giorgina; VERGANI, Diego. - Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach. *European Journal of Internal Medicine*. 48. (2018) 35–43.
- 80 LIN, Hung Pin *et al.* - Anemia and hematinic deficiencies in anti-gastric parietal cell antibody-positive or all autoantibodies-negative recurrent aphthous stomatitis patients. *Journal of the Formosan Medical Association*. 116 (2017) 99–106.