



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Inês Santos dos Reis

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Sara Domingues e pela Doutora Helena Cunha Leal e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Maria Inês Santos dos Reis

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Sara Domingues e pela Doutora Helena
Cunha Leal, e apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra

Setembro 2019

Agradecimentos

Acima de tudo, agradeço à minha família, nomeadamente ao meu namorado por todo o apoio que me deu durante este percurso, às minhas avó Lisette e tia Ema, que sempre me incentivaram a dedicar-me à minha formação académica e principalmente aos meus pais que tornaram tudo isto real.

Aos meus amigos por terem feito parte desta etapa da minha vida e por todo o apoio que me ofereceram.

Ao Dr. Eduardo Queijo por me ter dado a oportunidade de realizar o estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas no Coimbralab.

A toda a equipa do Coimbralab, em especial à Dra. Helena Cunha Leal, Dra. Maria João Tomás, Dra. Paula Prata e Dr. Marco Póvoa, pela forma como me receberam e por tudo o que me ensinaram durante o estágio curricular.

À Professora Doutora Sara Domingues pela orientação na realização deste relatório.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	9
Resumo.....	11
Abstract.....	11
1. Introdução.....	13
2. Coimbralab.....	13
3. Procedimento pré-analítico.....	13
4. Amostras.....	14
5. Controlo de qualidade.....	14
5.1. Controlo de qualidade interno.....	14
5.2. Controlo de qualidade externo.....	14
6. Bioquímica.....	15
6.1. Amostras e equipamentos.....	15
6.2. Controlos de qualidade interno e externo.....	15
7. Hematologia.....	15
7.1. Amostras, equipamentos e principais análises.....	15
7.2. Controlos de qualidade interno e externo.....	16
8. Endocrinologia.....	16
8.1. Amostras e equipamento.....	16
8.2. Controlos de qualidade interno e externo.....	16
9. Imunologia.....	17
9.1. Amostras.....	17
9.2. Controlo de qualidade.....	17
9.2.1. Controlo de qualidade interno.....	17
9.2.2. Controlo de qualidade externo.....	18
9.3. Equipamento <i>Architect i2000sr</i>	18
9.3.1. Modo de funcionamento do equipamento.....	18
9.3.2. Análises efetuadas no equipamento.....	19
9.3.2.1. Congénitas – Painel TORC (Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus).....	19
a) Toxoplasmose.....	19
b) Rubéola.....	21
c) Citomegalovírus.....	22
9.3.2.2. Doenças Infeciosas.....	22
a) Vírus da imunodeficiência humana.....	22
9.3.2.3. Hepatites de causa viral.....	23
a) Hepatite A.....	23
b) Hepatite B.....	24
c) Hepatite C.....	24
9.3.2.4. Marcadores tumorais.....	25
a) Antígeno específico da próstata e fração livre de antígeno específico da próstata.....	25
b) CA 15-3.....	26
c) Antígeno carcinoembrionário.....	27
d) CA 125.....	27
e) CA 19-9.....	27
f) Alfa-fetoproteína e Subunidade beta da Gonadotrofina Coriônica Humana.....	28

9.3.2.5.	Doenças metabólicas	29
a)	Vitamina B12.....	29
b)	Folato/ácido fólico.....	30
c)	Vitamina D3 (25-hidroxivitamina D).....	31
9.3.2.6.	Insulina	31
9.4.	Equipamento <i>Olympus AU680</i>	32
9.4.1.	Modo de funcionamento do equipamento	32
9.4.2.	Análises efetuadas no equipamento.....	33
9.4.2.1.	Fator reumatoide.....	33
9.4.2.2.	Doseamento da proteína C reativa	34
9.4.2.3.	Título de antiestreptolisina O.....	34
9.5.	Testes rápidos serológicos e em urina e fezes.....	34
9.5.1.	Teste para deteção da sífilis – Teste “Reagina Plasmática Rápida”.....	35
9.5.2.	Teste para deteção da mononucleose – Reação de Paul-Bunnell	36
9.5.3.	Teste para o rastreio da febre tifóide – Reação de Widal	38
9.5.4.	Teste para deteção de doenças provocadas por bactérias do género <i>Rickettsia</i> – Teste de aglutinação Weil-Felix.....	38
9.5.5.	Teste para deteção da brucelose – Reação de Wright	39
9.5.6.	Teste imunológico de gravidez.....	40
9.5.7.	Teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes	40
10.	Microbiologia.....	41
10.1.	Amostras.....	41
10.2.	Controlo de qualidade	41
10.2.1.	Controlo de qualidade interno	41
10.2.2.	Controlo de qualidade externo.....	42
10.3.	Testes rápidos de pesquisa de <i>Streptococcus</i>	42
a)	Pesquisa de <i>Streptococcus</i> do grupo A.....	42
b)	Pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolítico do grupo B.....	43
10.4.	Inoculação das amostras e interpretação dos resultados	44
10.4.1.	Tipos de meios de cultura	44
a)	Meios de cultura não seletivos	44
b)	Meios de cultura de enriquecimento	44
c)	Meios de cultura seletivos	45
d)	Meios de cultura diferenciais	45
10.4.2.	Urocultura	45
10.4.2.1.	Interpretação das placas	46
10.4.3.	Inoculação de exsudatos.....	49
10.4.3.1.	Interpretação das placas	50
10.4.4.	Coprocultura	52
10.4.4.1.	Interpretação das placas	52
10.4.5.	Identificação de bactérias dos géneros <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i>	53
10.4.6.	Equipamento <i>Vitek Compact</i>	55
10.5.	Sedimento urinário	56
10.6.	Pesquisa de parasitas nas fezes.....	56
10.7.	Pesquisa de parasitas do género <i>Plasmodium</i> no sangue.....	57
11.	Procedimento pós-analítico	58
12.	Conclusão	59
13.	Bibliografia.....	61

Índice de Figuras

Figura 1 – Teste da Reagina Plasmática Rápida semi-quantitativo com positividade até à diluição 1/32	36
Figura 2 – Teste da Reagina Plasmática Rápida semi-quantitativo com positividade até à diluição 1/64	36
Figura 3 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Escherichia coli</i>	47
Figura 4 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Escherichia coli</i> e uma colónia de <i>Enterococcus faecalis</i>	47
Figura 5 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Escherichia coli</i>	47
Figura 6 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Escherichia coli</i>	47
Figura 7 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Proteus mirabilis</i>	47
Figura 8 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Proteus mirabilis</i>	47
Figura 9 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Klebsiella</i> spp.	48
Figura 10 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Klebsiella</i> spp.	48
Figura 11 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Pseudomonas</i> spp.	48
Figura 12 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Citrobacter koseri</i>	48
Figura 13 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Enterococcus faecalis</i>	48
Figura 14 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	49
Figura 15 – Placa de gelose CPSE com colónias de <i>Streptococcus agalactiae</i>	49
Figura 16 – Placa de gelose MCK com colónias de bactérias fermentadoras da lactose	50
Figura 17 – Placa de gelose MCK com colónias de bactérias não fermentadoras (transparentes/amareladas) e fermentadoras (rosa) da lactose	50
Figura 18 – Placa de gelose COS com colónias de bactéria α -hemolítica	51
Figura 19 – Placa de gelose CAN2 com crescimento de <i>Candida albicans</i>	51
Figura 20 – Placa de gelose CAN2 com crescimento de <i>Candida albicans</i>	51
Figura 21 – Placa de gelose CAN2 com crescimento de <i>Candida</i> spp.	51
Figura 22 – Placa de gelose HEKT com colónias de microrganismos não patogénicos	53

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Algumas características das espécies de <i>Plasmodium</i> que infetam os humanos (Adaptada de (Brooks et al., 2007))	58
---	----

Lista de Abreviaturas

25-OH D – Vitamina D3
Ac – Anticorpo
Ac HBc – Anticorpo HBc
Ac HBs – Anticorpo HBs
ACPA – Anticorpos contra proteína/peptídeo citrulinado anticíclico
AFP – α -fetoproteína
Ag – Antígeno
Ag HBs – Antígeno HBs
ALT – Alanina aminotransferase
ATG – Anti-tiroglobulina
ATPO – Anti-tiroperoxidase
CA – Antígeno cancerígeno
CAM – Gelose Campyloset
CAN2 – Gelose chromID Candida
CEA – Antígeno Carcinoembrionário
CMIA – Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência
CMV – Citomegalovírus
CMV IgG – Anticorpo IgG contra o Citomegalovírus
CMV IgM – Anticorpo IgM contra o Citomegalovírus
COS – Gelose Columbia + 5 % de sangue de carneiro
CPSE – Gelose chromID CPS
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EBV – Vírus Epstein-Barr
FI – Fator intrínseco
FOBT – Teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes
FPSA – Fração livre de antígeno específico da próstata
FR – Fator Reumatoide
FSH – Hormona Folículo-estimulante
FT3 – T3 livre
FT4 – T4 livre
HAV – Vírus da Hepatite A
HAV IgG – Anticorpo IgG contra o vírus da Hepatite A
HAV IgM – Anticorpo IgM contra o vírus da Hepatite A
HbA1c – hemoglobina glicada
HcG – Gonadotrofina Coriônica Humana
HCV – Vírus da Hepatite C
HEKT – Gelose Hektoen
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
Ig – Imunoglobulina
INR – Razão Internacional Normalizada
LH – Hormona Luteinizante
MCK – Gelose MacConkey
NAD – Dinucleótido nicotinamida adenina
ODC – Ornitina descarboxilase

ONPG – o-nitrofenil- β -galactopiranosídeo
PCR – Reação de Polimerase em Cadeia
PSA – Antígeno específico da próstata
PTH – Hormona Paratiroide
PVX – Gelose Chocolate PolyVitex
RNA – Ácido ribonucleico
RPR – Teste da reagina plasmática rápida
Rub – Rubéola
Rub IgG – Anticorpo IgG contra Rubéola
Rub IgM – Anticorpo IgM contra Rubéola
SEQC^{ML} – Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratório
T3 – T3 total
T4 – T4 total
TASO – Título de antiestreptolisina O
TORC – Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus
Toxo – Toxoplasma
Toxo IgG – Anticorpo IgG contra Toxoplasma
Toxo IgM – Anticorpo IgM contra Toxoplasma
TPSA – Antígeno específico da próstata total
TSH – Hormona Estimulante da Tiróide
UFCs – Unidades formadoras de colónias
UVB – Radiação solar ultravioleta B
VCA – Antígenos da cápside do vírus
VDRL – Antígeno Venereal Disease Research Laboratory

Resumo

A elaboração do presente relatório de estágio tem como objetivo a descrição das atividades realizadas no âmbito do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, efetuado no laboratório de análises clínicas Coimbralab. Este relatório inclui uma abordagem geral do local de estágio, uma descrição dos procedimentos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, assim como do controlo de qualidade de cada uma das áreas. Os procedimentos analíticos são os mais detalhados, focando-se principalmente nas áreas de Imunologia e Microbiologia.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Imunologia, Microbiologia, Serologia, Urocultura

Abstract

The elaboration of the following report aims to describe the developed activities in the curricular internship of the MSc degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of Coimbra University, that took place at the laboratory Coimbralab. This report includes a general approach of the internship, a description of the pre-analytical, analytical and post-analytical procedures, as well as the quality control of each area. The analytical procedures are the most detailed, focusing mainly on the Immunology and Microbiology areas.

Keywords: Clinical Analysis, Immunology, Microbiology, Serology, Urine Culture

1. Introdução

Ao longo dos dois anos do Mestrado em Análises Clínicas foram-nos transmitidos conhecimentos teóricos que, com alguma formação prática complementar, nos permitem desempenhar um papel ativo, como profissionais de saúde, no laboratório de análises clínicas, como tivemos oportunidade de experienciar durante o estágio curricular.

Os laboratórios de análises clínicas têm um papel fundamental na manutenção da qualidade de vida das populações, sendo os resultados analíticos obtidos essenciais não só para auxiliar o clínico a efetuar diagnósticos, mas também para alertar para a possibilidade de existência de determinadas patologias e acompanhar/monitorizar o tratamento das mesmas. Desta forma, o laboratório deve garantir a qualidade de todos os seus resultados.

Estes laboratórios têm vindo a sofrer alterações no seu funcionamento, utilizando-se cada vez mais equipamentos automáticos em detrimento das técnicas manuais, o que permite fornecer os resultados mais rapidamente e reduzir o número de erros pelo operador.

2. Coimbralab

O laboratório Coimbralab iniciou a sua atividade a 16 de Maio de 1984, tendo como objetivo a realização de análises clínicas. É constituído por um laboratório central na zona do Vale das Flores, em Coimbra e diversos postos de colheitas, tendo também ao dispor dos utentes serviço ao domicílio e algumas parcerias com instituições.

O laboratório integra vários setores funcionais, sendo estes: hematologia, coagulação, microbiologia, bioquímica, urianálise, coprologia, imunologia/imunoquímica, serologia, toxicologia, monitorização de drogas e um setor de endocrinologia laboratorial.

O Coimbralab é um laboratório certificado, de acordo com as duas normas: NP EN ISO 9001 e Normas para Laboratório Clínico.

Em 2018, o Coimbralab passou a fazer parte do grupo Unilabs.

3. Procedimento pré-analítico

As amostras biológicas passam por diversas etapas até chegarem ao laboratório. Para começar tem que ser feita a inscrição do utente e registo das análises a realizar, bem como de informações importantes acerca do utente (se toma algum tipo de medicação ou se tem algum problema de saúde, entre outras). O utente deve ser informado, pelos colaboradores do laboratório, dos procedimentos a seguir para as análises que irá realizar, como por exemplo

se necessita ou não de efetuar a colheita de sangue em jejum, ou no caso da colheita de urina a forma como esta deve ser realizada.

A fase que se segue à inscrição consiste na colheita e correta identificação das amostras biológicas a analisar. No Coimbralab é utilizado um sistema de identificação com etiquetas, em que cada uma contém: o nome do utente e o seu número de processo seguido da identificação do setor para onde deve ser encaminhada essa amostra, algumas indicações de como deve ser conservada a amostra (proteção da luz, centrifugar e separar, entre outras) e, no caso de colheita de sangue, a cor da tampa do tubo a utilizar.

Finalmente, as amostras são encaminhadas para o ponto de triagem do laboratório, em que se regista a entrada das mesmas e se efetua a sua distribuição por setores.

4. Amostras

Existem amostras de grande diversidade a serem analisadas no âmbito das análises clínicas, sendo que no Coimbralab as amostras mais comuns são: sangue total, soro, plasma, urina, fezes, exsudatos vaginal, uretral, retal, purulento e nasofaríngeo.

5. Controlo de qualidade

5.1. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é importante na avaliação da precisão, ou seja, da aproximação dos resultados dentro do próprio laboratório. Cada equipamento segue um plano de controlo interno.

5.2. Controlo de qualidade externo

O controlo externo é importante para garantir a exatidão dos resultados obtidos nos equipamentos utilizados no laboratório, comparando-os com os de outros laboratórios.

Este controlo é realizado todos os meses nos equipamentos de hematologia, coagulação e bioquímica, enquanto no equipamento de imunologia alguns parâmetros são controlados mensalmente e outros trimestralmente. Na microbiologia realiza-se um controlo trimestral no setor da bacteriologia e um controlo quadrimestral no setor da parasitologia.

6. Bioquímica

6.1. Amostras e equipamentos

No setor de bioquímica são analisados três tipos de amostras, sangue total, soro e urina. Para o processamento destas amostras são utilizados vários equipamentos, com diversas funções: a quantificação de parâmetros no soro e urina é realizada no *Olympus AU680*; a hemoglobina glicada (HbA1c) é quantificada no *HA8160*, sendo que para essa análise se utiliza sangue total; o sedimento urinário é analisado no *AutionMax* e observado no microscópio ótico; e a eletroforese de proteínas séricas é feita no *minicap*.

6.2. Controlos de qualidade interno e externo

No *Olympus AU680* é efetuada uma calibração diária da creatinina no soro, enquanto na urina se efetua apenas uma vez por semana. Os outros parâmetros são calibrados se houver mudança no lote de reagente ou quando o resultado do controlo excede o limite de controlo $\pm 2DP$ (média mais ou menos dois desvios padrão), segundo as regras de Westgard. (Westgard, 2002) No soro todos os parâmetros são controlados diariamente, com exceção das proteínas específicas, que são controladas uma vez por semana. Na urina, a creatinina e a microalbuminúria são controladas uma vez por semana.

No *minicap* o controlo é efetuado uma vez por semana.

O controlo externo é realizado uma vez por mês.

7. Hematologia

7.1. Amostras, equipamentos e principais análises

Na hematologia utilizam-se três tipos de amostra: sangue total, soro e plasma.

As principais análises deste setor são o hemograma (no equipamento *Pentra 80*), a velocidade de sedimentação (no *Vesmatic*), grupos sanguíneos, tempos de coagulação (tempo de protrombina e tromboplastina e Razão Normalizada Internacional (INR), sendo que estas se realizam no *Thrombolyzer*). São também efetuadas algumas técnicas manuais: esfregaços sanguíneos (contagem de reticulócitos, estudo morfológico do sangue periférico) e pesquisa de parasitas no sangue.

7.2. Controlos de qualidade interno e externo

Nos equipamentos destinados aos hemogramas e à velocidade de sedimentação são efetuados dois níveis de controlo diariamente, sendo que se usam dois níveis por semana alternando entre baixo, normal e alto.

No *Thrombolyzer* são efetuados dois níveis de controlo diariamente, controlo 1 (baixo) e controlo 2 (alto).

O controlo externo é realizado mensalmente.

8. Endocrinologia

8.1. Amostras e equipamento

Neste setor o soro é a amostra mais analisada e o equipamento utilizado é o mesmo do setor de imunologia, o *Architect i2000sr*.

8.2. Controlos de qualidade interno e externo

O laboratório tem um plano de controlo interno para o equipamento *Architect i2000sr*, em que todos os testes são controlados uma vez por semana e calibrados quando se altera um lote de reagente ou quando o resultado do controlo excede o limite de controlo $\pm 2DP$ (média mais ou menos dois desvios padrão), segundo as regras de Westgard. (Westgard, 2002)

São utilizados dois tipos de controlo: multiparamétrico e de analito único. O controlo multiparamétrico engloba os seguintes parâmetros de endocrinologia: Anti-tiroglobulina (ATG), Anti-tiroperoxidase (ATPO), Estradiol, Testosterona, Hormona Folículo-estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), T3 total (T3), Hormona Estimulante da Tiróide (TSH) e Prolactina, enquanto os parâmetros Hormona Paratiroide (PTH), T3 livre (FT3), T4 livre (FT4), T4 total (T4) e Progesterona são controlados por um controlo de analito único.

O controlo externo é realizado mensalmente, utilizando amostras enviadas pela Sociedade Espanhola de Medicina de laboratório (SEQC^{ML}) que depois analisa os resultados obtidos em cada laboratório participante no programa de avaliação externa e encaminha para os mesmos um relatório com a comparação dos resultados de todos.

Os parâmetros do setor de endocrinologia controlados mensalmente são os seguintes: Cortisol, Estradiol, Testosterona, LH, FSH, Progesterona, Prolactina, PTH, TSH, T4, FT4, T3, FT3.

9. Imunologia

9.1. Amostras

Neste setor a amostra mais analisada é o soro, efetuando-se também algumas análises a fezes e urina, sendo algumas das técnicas manuais. O equipamento destinado ao setor de imunologia é o *Architect i2000sr*, sendo que o *Olympus AU680* também é utilizado para algumas análises.

9.2. Controlo de qualidade

9.2.1. Controlo de qualidade interno

O laboratório tem um plano de controlo de qualidade interno para o equipamento *Architect i2000sr*, em que todos os testes são controlados uma vez por semana e calibrados quando se altera um lote de reagente ou quando o resultado do controlo excede o limite de controlo $\pm 2DP$ (média mais ou menos dois desvios padrão), segundo as regras de Westgard. (Westgard, 2002)

São utilizados dois tipos de controlo: multiparamétrico e de analito único. O controlo multiparamétrico engloba os seguintes parâmetros: Gonadotrofina Coriônica Humana (β -HcG), α -fetoproteína (AFP), CA-125, Antígeno Carcinoembrionário (CEA), Antígeno específico da próstata livre (PSA livre – FPSA) e Vitamina B12 enquanto os parâmetros Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus da Hepatite C (HCV), Antígeno de superfície da hepatite B (Ag HBs), Anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B (Ac HBs), Anticorpo IgG contra o antígeno do núcleo da hepatite B (Ac HBc IgG), Anticorpo IgM contra o antígeno do núcleo da hepatite B (Ac HBc IgM), Anticorpo IgG contra o Vírus da Hepatite A (HAV IgG), Anticorpo IgM contra o Vírus da Hepatite A (HAV IgM), CA 15-3, CA 19-9, Antígeno específico da próstata (PSA total – TPSA), Folato/Ácido fólico, Toxoplasma IgG (Toxo IgG), Toxoplasma IgM (Toxo IgM), Rubéola IgG (Rub IgG), Rubéola IgM (Rub IgM), Citomagalovírus IgG (CMV IgG), Citomegalovírus IgM (CMV IgM), Insulina, Vitamina D3 (25-OH) são controlados por um controlo de analito único.

As análises efetuadas no *Olympus AU680*, título de antiestreptolisina O (TASO), fator reumatoide (FR) e proteína C reativa, são controladas uma vez por semana e calibradas quando há uma mudança de reagente para um novo lote, ou quando o resultado do controlo excede o limite de controlo $\pm 2DP$ (média mais ou menos dois desvios padrão), segundo as regras de Westgard. (Westgard, 2002)

9.2.2. Controlo de qualidade externo

O controlo externo é realizado mensalmente, utilizando amostras enviadas pela Sociedade Espanhola de Medicina de laboratório (SEQC^{ML}) que depois analisa os resultados obtidos em cada laboratório participante no programa de avaliação externa e encaminha para os mesmos um relatório com a comparação dos resultados de todos.

Os parâmetros controlados mensalmente são: β -HcG, AFP, CEA, PSA total, PSA livre, Folato, Vitamina B12.

Os parâmetros Ag HBs, Ac HBc, Ac HCV, Rub IgG e Toxo IgG são controlados trimestralmente.

9.3. Equipamento *Architect i2000sr*

9.3.1. Modo de funcionamento do equipamento

O *Architect i2000sr* usa como método de deteção e quantificação de analitos o Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência (CMIA).

Num imunoensaio é usado um anticorpo como reagente para deteção de um determinado analito (antigénio), enquanto num imunoensaio por quimioluminescência, é usada uma molécula quimioluminescente como indicador, de forma a detetar e quantificar as reações imunológicas, sendo o acridínio uma das moléculas quimioluminescentes mais usadas (como é o caso do equipamento utilizado no Coimbralab). A oxidação, em ambiente alcalino, do estér de acridínio por peróxido de hidrogénio, na presença de um detergente, emite luz a 429 nm. (Burtis *et al.*, 2008)

O CMIA utiliza micropartículas paramagnéticas revestidas com um anticorpo/antigénio/partícula viral específico para se ligar ao analito, um anticorpo/antigénio/partícula viral conjugado com acridínio, uma solução pré-ativadora e uma solução ativadora. (Wild, 2013)

A solução pré-ativadora contém peróxido de hidrogénio, tem a capacidade de manter um ambiente ácido (evitando a emissão prematura de luz) e de evitar a aglomeração das micropartículas e elimina a matéria corante do acridínio do conjugado combinado com o complexo de micropartículas, preparando a matéria corante do acridínio para a etapa que se segue. (Wild, 2013)

A solução ativadora contém hidróxido de sódio, que alcaliniza o meio provocando a oxidação do acridínio pelo peróxido de hidrogénio, ocorrendo a emissão de luz. (Wild, 2013)

A emissão de luz é medida durante um período de tempo pré-definido, de forma a quantificar a concentração de analito ou determinar interpretações qualitativas para os ensaios de índice (cutoff). (Wild, 2013)

Reação de CMIA:

- i. A amostra é pipetada para a cuvete de reação.
- ii. São pipetadas micropartículas paramagnéticas, revestidas com a molécula que se vai ligar ao analito, para a cuvete de reação.
- iii. A cuvete com a mistura de reação é agitada de forma a homogeneizar a mesma.
- iv. O analito liga-se às moléculas que revestem as partículas paramagnéticas, formando um complexo.
- v. As partículas paramagnéticas são atraídas, para uma parede da cuvete, por um ímã e a cuvete é lavada para eliminar os materiais não combinados.
- vi. As moléculas conjugadas com acridínio são pipetadas para a cuvete de reação, combinando-se com o complexo, completando assim a mistura de reação.
- vii. Após a incubação da mistura de reação, a cuvete passa por uma nova lavagem para remover os materiais não combinados.
- viii. A solução pré-ativadora é adicionada à cuvete de reação e o sistema ótico efetua uma leitura de background.
- ix. A solução ativadora é adicionada à cuvete de reação.
- x. O sistema ótico mede a emissão por quimioluminescência. (Wild, 2013)

9.3.2. Análises efetuadas no equipamento

9.3.2.1. Congénitas – Painel TORC (Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus)

a) Toxoplasmose

O agente etiológico da toxoplasmose é *Toxoplasma gondii*, um microrganismo unicelular, protozoário, pertencente ao filo *Apicomplexa*. Normalmente a infeção em adultos é assintomática, mas pode também apresentar um quadro clínico semelhante a uma gripe. A taxa de transmissão materno-fetal é menor no primeiro trimestre do que no terceiro, mas as consequências para o feto são mais graves se a infeção ocorrer no primeiro trimestre, podendo ocorrer desde sequelas neurológicas a aborto. (Ahmad *et al.*, 2014; Martins, 2002)

O ciclo sexual deste parasita dá-se no seu hospedeiro definitivo, indivíduos da família *Felidae*. O ooquistos de *Toxoplasma gondii* é resistente a mudanças ambientais e pode ser ingerido pelo Homem ou outro hospedeiro intermediário, dando depois origem ao esporozoítos, que inicia o seu ciclo assexuais. O esporozoítos penetra o epitélio intestinal dando

origem a taquizoítos, que são a forma que provoca infecção sistêmica e tem a capacidade de infectar e de se replicar em todas as células (exceto glóbulos vermelhos) dos mamíferos, podendo também atravessar a placenta e infectar o feto. Após a replicação dos taquizoítos no interior das células, estas rompem, libertando mais taquizoítos que se vão disseminar no organismo do hospedeiro. Passado algum tempo podem formar-se quistos tecidulares, que contêm bradizoítos e são infecciosos quando ingeridos. Os bradizoítos são mais pequenos do que os taquizoítos e dividem-se mais lentamente, quando são libertados podem invadir todas as células e permanecem nos diversos órgãos para o resto da vida. (Ahmad *et al.*, 2014; Gagne, 2001)

Existem quatro formas de toxoplasmose congénita: doença neonatal sintomática, doença de gravidade média a severa no primeiro mês, sequelas na infância ou adolescência devido ao facto de a infecção não ter sido diagnosticada e, por fim, infecção subclínica. (Gagne, 2001)

É portanto habitual fazer-se o rastreio de toxoplasmose na gravidez, sendo que o método mais usado consiste na realização de testes serológicos que se baseiam na titulação de anticorpos específicos IgM e IgG para a toxoplasmose. (Martins, 2002)

Os anticorpos específicos IgM surgem no sangue nos primeiros dias de uma primoinfecção, aumentando o seu nível durante cerca de dois meses e desaparecendo nos meses seguintes (até 18 meses). Os anticorpos IgG surgem cerca de uma a duas semanas após a infecção, atingindo os valores mais elevados entre o primeiro mês e o segundo mês, sofrendo depois um decréscimo gradual, mas permanecendo presentes por toda a vida em concentrações mais baixas. (Gagne, 2001; Martins, 2002)

Após a realização do rastreio, se for verificado que a mulher não está imunizada contra a toxoplasmose, esta deve efetuar uma monitorização serológica da doença durante a gravidez, pelo menos uma vez em cada trimestre ou se houver suspeita de infeção.

Se a análise for positiva para IgG e negativa para IgM, considera-se que o risco é reduzido e que a IgG confere imunidade. (Martins, 2002)

Se a análise for negativa para IgG e positiva para IgM pode indicar que existe infeção aguda. O resultado deve ser verificado por uma técnica diferente para evitar falsos positivos. Neste caso a mulher grávida deve iniciar tratamento e repetir a serologia após 3 semanas. Se o resultado da análise se mantiver significa que a mulher possui anticorpos não específicos, mas se alterar para IgG positiva e IgM positiva confirma que se trata de uma primoinfecção recente. (Martins, 2002)

Por último, se o resultado da análise for positivo tanto para IgG como para IgM indica a existência de uma primoinfecção recente ou de uma infeção antiga com IgM residuais. (Martins, 2002)

b) Rubéola

O vírus da rubéola pertence à família *Togaviridae* e ao género *Rubivirus* e é um vírus de ácido ribonucleico (RNA), envelopado. Tem como único reservatório o Homem, e a sua transmissão ocorre por contacto direto com secreções nasofaríngeas de indivíduos infetados, tendo como período de incubação cerca de 14 a 21 dias, havendo uma maior incidência da doença no final do inverno e início da primavera. Indivíduos com infeção primária podem transmitir o vírus desde 7 dias antes do aparecimento das erupções cutâneas até 7 dias depois. (Ahmad *et al.*, 2014; PORTUGAL. Direção Geral de Saúde, 2000)

A doença começa com mal-estar, febre baixa, sintomas no trato respiratório superior e com o aparecimento de uma erupção cutânea na cara, que depois se estende pelo tronco e extremidades, com duração de até 3 dias. Em adultos, especialmente em mulheres, podem ocorrer artralgias e artrites transitórias como complicação da doença. (Ahmad *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2007)

A infeção na mulher grávida pode ser assintomática e o vírus tem a capacidade de atravessar a placenta, podendo trazer consequências graves para o feto, desde malformações congénitas a aborto espontâneo. (PORTUGAL. Direção Geral de Saúde, 2000)

A transmissão vertical é mais frequente no primeiro trimestre, sendo que à medida que a placenta se vai desenvolvendo, e ficando mais madura, começa a funcionar como barreira à passagem do vírus. As anomalias causadas no feto podem ser transitórias ou tardias (endocrinopatias e anomalias vasculares). As crianças que tenham sido infetadas congenitamente podem transmitir o vírus durante pelo menos 6 meses após o nascimento. (Ahmad *et al.*, 2014; PORTUGAL. Direção Geral de Saúde, 2000)

Assim como na toxoplasmose, são também realizados rastreios através de testes serológicos, fazendo-se a pesquisa de anticorpos IgG e IgM. (PORTUGAL. Direção Geral de Saúde, 2000)

Se a análise for positiva, com valores médios a elevados para IgG e negativa para IgM considera-se que a mulher é imune à rubéola. Se os valores de IgG forem baixos, a análise deve ser repetida após 2 a 3 semanas e se ocorrer um aumento de 4 vezes dos níveis de IgG ou se a IgM positivar significa que ocorreu infeção, enquanto que se os valores de IgG se mantiverem significa que a mulher é imune. (PORTUGAL. Direção Geral de Saúde, 2000)

Se a análise for negativa para IgG e positiva para IgM significa que está a ocorrer infeção. (PORTUGAL. Direção Geral de Saúde, 2000)

c) Citomegalovírus

O Citomegalovírus humano (CMV) é um vírus da família *Herpesviridae*, de ácido desoxirribonucleico (DNA), que tem um efeito citopático, produzindo inclusões citoplasmáticas e citomegalia (aumento da célula), nas células por ele infetadas. É um vírus que apresenta elevada especificidade para a espécie e determinadas células. (Ahmad *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2007)

O CMV é transmitido pessoa-a-pessoa através de contacto próximo e sexual e contacto com material biológico (saliva, secreções nasofaríngeas, urina, sangue, secreções cervicais e sémen) contaminado com o vírus. Este tem um período de incubação de cerca de 4 a 8 semanas após a exposição ao vírus em crianças normais e adultos, e provoca uma infeção sistémica, estabelecendo depois infeção latente para o resto da vida. (Ahmad *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2007)

A infeção por CMV no feto ou em recém-nascidos pode ser severa, sendo que a maioria destas crianças pode vir a apresentar defeitos de desenvolvimento e atraso mental, podendo também ocorrer hepatoesplenomegalia, icterícia, anemia, entre outras. O vírus pode ser transmitido no útero, tanto em infeções primárias como em reativações da infeção, mas este último caso raramente resulta em danos no feto. A criança pode também ser exposta ao CMV no trato genito-urinário da mãe durante o nascimento, assim como através do leite materno, mas nestes casos são administrados anticorpos à criança e a infeção tende a ser subclínica. (Brooks *et al.*, 2007)

É comum efetuar-se o rastreio de CMV nas grávidas, sendo que este se baseia na deteção de anticorpos IgG e IgM contra CMV no soro. A presença de IgG sugere uma infeção passada e a presença de IgM uma infeção recente. No caso de um resultado ser positivo deve ser repetido e se este se mantiver a amostra é enviada para um laboratório externo para ser confirmado pela mesma técnica num equipamento diferente. O resultado pode ainda ser confirmado por PCR ou pelo isolamento do vírus. (Brooks *et al.*, 2007)

9.3.2.2. Doenças Infeciosas

a) Vírus da imunodeficiência humana

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus, ou seja, codifica a enzima transcriptase reversa, que converte o RNA numa cadeia dupla de DNA. Existem dois tipos de HIV que provocam a Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA), sendo estes o HIV-1 e o HIV-2. (Ahmad *et al.*, 2014)

O diagnóstico da infeção por HIV inicia-se por fazer uma pesquisa de antígenos virais ou de anticorpos contra o vírus. As técnicas usadas nestas pesquisas apresentam uma elevada sensibilidade mas uma baixa especificidade (elevada taxa de falsos positivos), o que leva a que resultados positivos tenham que ser sempre confirmados por outras técnicas. (Ahmad *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2015)

Quando o resultado do teste é “não reativo” considera-se negativo, enquanto no caso de o teste dar um resultado “reativo” este deve ser repetido, e se a repetição mantiver a reatividade deve ser então efetuado um teste confirmatório. (Cui *et al.*, 2015) Neste caso, a amostra é enviada para um laboratório externo, onde é depois efetuada a mesma técnica num equipamento diferente. O resultado pode ainda ser confirmado pela técnica de Western Blot, que deteta anticorpos contra proteínas específicas do HIV. (Ahmad *et al.*, 2014)

Os anticorpos não são detetáveis através destas técnicas nas primeiras 6 a 12 semanas após o início da infeção, período no qual o vírus pode ser transmitido, tanto por contacto sexual como por contacto com sangue infetado (transusão sanguínea, entre outras). Já o RNA do HIV é detetável no plasma a partir de 6 a 10 dias após o início da infeção, por reação de polimerase em cadeia (PCR). (Ahmad *et al.*, 2014)

9.3.2.3. Hepatites de causa viral

a) Hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV) pertence à família *Picornaviridae* e ao género *Hepatovirus*. Este vírus é de grande resistência a ambientes extremos (esgotos, pH do estômago) sendo considerado a maior causa de hepatite aguda viral. Os picornavírus são viriões com cápside composta por quatro proteínas (VP1 a VP4), sendo o seu genoma constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples. Este vírus é transmitido por via fecal-oral e a doença pode ser assintomática em cerca de 50 % dos adultos ou apresentar manifestações clínicas como: febre e icterícia, perda de apetite e dor no quadrante abdominal superior direito. Estas manifestações podem ser acompanhadas de urina escura, hepatomegalia e alteração dos valores dos marcadores hepáticos (aminotransferases e níveis de bilirrubina elevados). (Ahmad *et al.*, 2014; Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

O diagnóstico é efetuado através da pesquisa de anticorpos contra HAV no soro. Os anticorpos IgM encontram-se maioritariamente presentes no início da infeção, permanecendo detetáveis durante semanas a meses, enquanto os anticorpos IgG são a classe predominante no período de convalescença, permanecendo no soro indeterminadamente, ou seja, a presença isolada de IgG no soro não é indicativa de uma infeção recente. (Ahmad *et al.*, 2014)

b) Hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV) pertence à família *Hepnaviridae* e ao género *Orthohepadnavirus* e é um vírus de DNA, envelopado. Ao contrário do que acontece com o vírus da hepatite A, alguns dos indivíduos infetados tornam-se portadores de HBV. Este vírus é transmitido através do contacto com fluidos corporais de indivíduos infetados. As manifestações mais comuns da hepatite B aguda são fadiga, náuseas, perda de apetite e dor no quadrante abdominal superior direito. (Ahmad *et al.*, 2014)

Níveis elevados de antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs), DNA de HBV e de antígeno “e” do vírus da hepatite B (AgHBe) podem ser detetados no soro durante uma infeção aguda. O antígeno do núcleo da hepatite B (AgHBc) pode também estar presente na infeção aguda, mas a sua presença pode ser mascarada pela existência de anticorpos contra o mesmo. Mais tarde podem ser detetados os anticorpos anti-HBs e anti-HBe, que removem os antígenos HBs e HBe, respetivamente. O anticorpo anti-HBs confere proteção contra uma nova infeção e o anticorpo anti-HBc pode ser detetado numa fase inicial da infeção e permanecer no soro durante anos. O diagnóstico de hepatite B recente baseia-se essencialmente na pesquisa de antígenos virais e anticorpos contra o vírus, principalmente de anticorpos IgM contra o AgHBc, visto que permanecem no soro apenas entre 6 a 12 meses após a infeção aguda, enquanto os anticorpos IgG anti-HBc e anti-HBs caracterizam uma infeção antiga (as vacinas induzem apenas a produção de anticorpos anti-HBs). (Ahmad *et al.*, 2014)

Em indivíduos com hepatite B crónica, o AgHBs pode ser detetado em períodos de infeção ativa (não se desenvolve anticorpo anti-HBs), assim como o anticorpo anti-HBc. Existem dois tipos de hepatite B crónica: numa é detetado AgHBs, mas não AgHBe e na outra são ambos detetados. O desenvolvimento de anticorpo anti-HBe associa-se a uma melhoria clínica. (Ahmad *et al.*, 2014)

c) Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) pertence à família *Flaviviridae* e ao género *Hepacivirus*. É um vírus de RNA envelopado e é transmitido através do contacto com sangue de indivíduos infetados. (Ahmad *et al.*, 2014)

A incubação do HCV ocorre em média entre 6 a 12 semanas e a maioria das infeções são assintomáticas, mas resultam numa grande percentagem de portadores crónicos do vírus. A hepatite C crónica pode estar associada a valores elevados de alanina aminotransferase (ALT) no soro e é uma das principais causas infecciosas de doença crónica do fígado e necessidade de transplante do mesmo. (Ahmad *et al.*, 2014)

O diagnóstico de HCV é efetuado com base na pesquisa de anticorpos contra HCV no sangue, pois os seus antígenos não são detetáveis no mesmo. Na infecção aguda por HCV a pesquisa de anticorpos no sangue é negativa entre 1 a 3 semanas após o início da infecção. (Ahmad *et al.*, 2014)

9.3.2.4. Marcadores tumorais

Entende-se como marcador tumoral qualquer substância de caráter bioquímico, que seja produzida ou induzida pelas células neoplásicas e que possa refletir o crescimento e/ou atividade das mesmas, de forma a permitir a detecção de um tumor maligno, bem como avaliar a sua evolução e a resposta terapêutica. Assim, é aceitável considerar que os marcadores tumorais são moléculas produzidas pelas células neoplásicas e que se podem localizar no próprio tumor (na forma de antígeno de superfície), ou no sangue, urina e outros líquidos orgânicos. (Magro e Bento, 1997)

Um marcador tumoral deve ser sensível (estar elevado na maioria dos doentes) e específico do tumor que se pretende detetar. Visto que muitas destas substâncias não são produzidas apenas por células neoplásicas só têm valor de diagnóstico quando acompanhadas por outros exames. (Magro e Bento, 1997)

Para além disso é importante averiguar se os níveis de marcador tumoral estão elevados no momento do diagnóstico, porque nesse caso, o mesmo será útil na monitorização da resposta à terapêutica e, após o tratamento, na pesquisa do aparecimento de recidivas. (Magro e Bento, 1997)

a) Antígeno específico da próstata e fração livre de antígeno específico da próstata

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma proteína produzida pelas células da glândula prostática, podendo circular ligado a outras proteínas ou na sua forma livre. É utilizado como biomarcador na detecção e monitorização do cancro da próstata, podendo os seus níveis aumentar também noutras situações, como numa prostatite ou na hiperplasia benigna da próstata. (Ankerst *et al.*, 2016; Ferrari, 2009)

Se forem detetados valores elevados de PSA (sendo que se considera como limite normal 4,0 ng/mL) e de forma a evitar cirurgias desnecessárias, que têm como consequências incontinência urinária e disfunção erétil, deve efetuar-se a razão entre a fração livre de PSA (FPSA) e o PSA, que é especialmente útil quando os valores de PSA se situam entre 4 ng/mL e 10 ng/mL, sendo que se considera que quando esta razão é inferior a 0,15 é sugestiva de

cancro da próstata, enquanto valores elevados (superiores a 0,25) sugerem a presença de doença benigna da próstata. (Dias, 2018; George, 2017; Ito *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 2003)

No caso de o PSA ser utilizado como rastreio e resultar em valores sugestivos de cancro da próstata devem sempre realizar-se de seguida outros exames para confirmação, sendo esses o toque retal e uma biópsia da próstata. (Ankerst *et al.*, 2016; Perkins *et al.*, 2003)

Se o cancro apresentar valores elevados de PSA, a determinação posterior deste marcador deve ser usada para a avaliação da resposta ao tratamento e para deteção do aparecimento de recidivas. (Ankerst *et al.*, 2016; Perkins *et al.*, 2003)

b) CA 15-3

O CA 15-3 é frequentemente usado como marcador tumoral do cancro da mama invasivo. Neste ensaio são usados dois anticorpos monoclonais que reconhecem diferentes epítomos de CA 15-3. (Chourin *et al.*, 2009; Praça *et al.*, 2017) O CA 15-3 é uma glicoproteína, codificada pelo gene da DF3 humano, associada à membrana e que é expressa nas zonas apicais das células epiteliais mamárias de secreção, mas quando há uma alteração maligna, esta pode vir a ser expressa em toda a superfície da membrana das células do carcinoma e no citoplasma. Isto implica que esta glicoproteína apresente uma elevada expressão nas células do cancro da mama. (Duffy, Evoy e McDermott, 2010; Yamamoto *et al.*, 1997)

Um aumento de CA 15-3 de cerca de 5 a 10 vezes o valor normal pode prever a existência de cancro da mama, mas um valor inferior não exclui a hipótese da existência de metástases. Assim, podemos afirmar que este marcador não é muito eficaz para o diagnóstico, mas é útil como auxiliar da terapêutica. (Praça *et al.*, 2017)

Um valor normal de CA 15-3 situa-se entre 30 a 60 UI/mL. (Stieber *et al.*, 2015)

O ensaio de CA 15-3 consiste na determinação quantitativa deste antígeno no soro, usando o anticorpo monoclonal DF3 (contra a fração enriquecida da membrana no cancro da mama, que reage com epítomos expressos por uma família de glicoproteínas de elevado peso molecular) e o anticorpo monoclonal I15D8 (contra a membrana dos glóbulos de gordura do leite humano). Neste imunoensaio o antígeno CA 15-3 presente na amostra vai ligar ao anticorpo monoclonal I15D8 revestido com micropartículas magnéticas, que faz parte do reagente, sendo depois adicionado o anticorpo monoclonal DF3 marcado com acridínio, que vai também ligar ao CA 15-3, resultando numa reação quimioluminescente. (Duffy, Evoy e McDermott, 2010)

c) Antígeno carcinoembrionário

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína oncofetal expressa normalmente em diversos tecidos, nomeadamente em células mucosas, e os seus níveis podem encontrar-se aumentados em vários tipos de cancro e outras doenças. (Hao, Zhang e Zhang, 2019; Perkins *et al.*, 2003) Desta forma, a determinação dos níveis de CEA não é de grande utilidade para o diagnóstico, sendo realizada, na maioria dos casos, após a confirmação do diagnóstico de doença maligna, sendo uma parte essencial da monitorização dos indivíduos com cancro colo-retal, bem como dos indivíduos com cancro da mama. (American Society of Clinical Oncology., 1996; Jäger *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 2003)

Se um indivíduo apresentar níveis elevados de CEA, juntamente com presença de sangue oculto nas fezes e com sangramento ao defecar, significa que o mesmo tem uma elevada probabilidade de sofrer de cancro colo-retal. (Magro e Bento, 1997)

Consideram-se valores normais para o CEA abaixo de 2,5 ng/mL e, para fumadores, abaixo de 5 ng/mL. (Perkins *et al.*, 2003)

d) CA 125

O CA 125 é uma glicoproteína de elevado peso molecular, que é expressa por uma grande parte das células epiteliais cancerígenas do ovário. (Moss, 2005) É usado para rastreio em mulheres com síndromes hereditárias de cancro do ovário e como auxiliar de diagnóstico de massas pélvicas, essencialmente em mulheres com massas pélvicas palpáveis assintomáticas, principalmente na menopausa, uma vez que antes da menopausa existem mais fatores benignos que levam ao aumento dos níveis de CA 125. É também útil para auxiliar as decisões terapêuticas e na deteção do aparecimento de recidivas. (Perkins *et al.*, 2003) Este antígeno é detetado pelo anticorpo monoclonal OC125 e, apesar de ter sensibilidade e especificidade baixas, tem um papel importante no diagnóstico do cancro das células epiteliais do ovário. Várias doenças, tanto malignas como benignas, podem dar origem a falsos positivos, o que faz com que o CA 125 sirva como marcador para outras doenças. (Moss, 2005)

Consideram-se normais valores de CA 125 inferiores a 35 UI/mL. (Perkins *et al.*, 2003)

e) CA 19-9

O CA 19-9 é uma molécula de adesão intracelular expressa na superfície das células tumorais. Está relacionada com os antígenos dos grupos sanguíneos Lewis, sendo que apenas os indivíduos pertencentes ao grupo Le (α - β +) ou Le (α + β -) expressam o antígeno CA 19-9. Este é usado como marcador tumoral em indivíduos com cancro do trato pancreático e biliar, mas os seus níveis também se podem encontrar aumentados noutras doenças malignas e

benignas, nomeadamente em outros tumores gastrointestinais. Considera-se 37 UI/mL o valor normal limite para este marcador tumoral. (Ballehaninna e Chamberlain, 2012; Perkins *et al.*, 2003)

Este antigénio não tem utilidade no diagnóstico se for determinado isoladamente, mas é muito usado em situações clínicas consistentes com cancro pancreático, sendo que valores de 1000 UI/mL sugerem a presença de metástases. (Perkins *et al.*, 2003)

Uma combinação de perda de peso superior a 9 kg, bilirrubina superior a 3 mg/dL e níveis de CA 19-9 superiores a 37 UI/mL levam a um diagnóstico positivo de cancro pancreático. (Ballehaninna e Chamberlain, 2012)

f) Alfa-fetoproteína e Subunidade beta da Gonadotrofina Coriônica Humana

A alfa-fetoproteína (AFP) é uma proteína que se encontra no soro fetal, mas que se torna indetetável após o nascimento (níveis inferiores a 15 ng/mL), sendo que aumentos posteriores do mesmo sugerem a presença de uma doença maligna. No feto é sintetizada no saco vitelino, no fígado e no intestino. É usada como marcador tumoral para o carcinoma hepatocelular primário (valores podem ser superiores a 1000 ng/mL) e tumores testiculares não seminomatosos (com origens em diversas células dos testículos e tendência a um rápido crescimento e disseminação) das células germinativas. Os seus níveis também podem sofrer aumentos noutras doenças, mas nestes casos raramente atingem valores superiores a 1000 ng/mL. (Bialecki e Bisceglie, Di, 2005; Montgomery *et al.*, 2011; Perkins *et al.*, 2003)

O diagnóstico do carcinoma hepatocelular inclui vários testes, sendo estes a determinação de AFP no soro, imagem radiográfica e biópsia do fígado. Valores de AFP acima de 500 ng/mL em indivíduos com massa hepática e fatores de risco para carcinoma hepatocelular são suficientes para o diagnóstico do mesmo. (Bialecki e Bisceglie, Di, 2005; Perkins *et al.*, 2003)

O tumores não seminomatosos das células germinativas testiculares dividem-se em coriocarcinoma, saco vitelino, embrionário e teratoma, sendo que em todos eles, com exceção do coriocarcinoma, se pode encontrar um nível elevado (superior a 40 ng/mL) de AFP, o que leva à sua utilização como auxiliar de diagnóstico do exame histopatológico, que é a forma de diagnóstico mais utilizada, exceto em situações em que não é aconselhável (indivíduos com marcadores tumorais elevados e metástases sintomáticas). A AFP pode também ser utilizada para avaliar o aparecimento de recidivas. (Montgomery *et al.*, 2011)

A Subunidade beta da Gonadotrofina Coriônica Humana (β -HcG) é geralmente produzida pela placenta. Apresenta níveis elevados na gravidez, em tumores das células germinativas e na doença trofoblástica gestacional (complicação neoplásica rara da gravidez), sendo que se consideram normais valores inferiores a 5 mUI/mL. (Perkins *et al.*, 2003)

Assim como a AFP, esta tem um papel importante na monitorização de doentes com tumores testiculares, sendo que alguns tumores seminomatosos das células germinativas podem aumentar os níveis de β -HcG mas qualquer tumor testicular com componente de AFP é não seminomatoso. Tal como a maioria dos marcadores mencionados até agora este também não tem um papel ativo no diagnóstico, exceto em alguns casos específicos, como por exemplo, em pacientes com doença ou metástases extragonadais na altura do diagnóstico de tumor não seminomatoso das células germinativas. (Perkins *et al.*, 2003)

Valores de AFP superiores a 10 000 ng/mL juntamente com valores de β -HcG superiores a 50 000 mUI/mL em diagnósticos iniciais traduzem um mau prognóstico, enquanto indivíduos nos mesmos estádios da doença, mas com valores de AFP e β -HcG inferiores têm uma maior probabilidade de cura. (Perkins *et al.*, 2003)

A determinação periódica destes dois marcadores tumorais apresenta um papel importante na monitorização do tratamento e aparecimento de recidivas em indivíduos com tumor não seminomatoso das células germinativas. (Perkins *et al.*, 2003)

9.3.2.5. Doenças metabólicas

a) Vitamina B12

A vitamina B12, ou cianocobalamina, é uma vitamina hematopoiética solúvel em água, que é necessária para a maturação dos eritrócitos. As principais fontes desta vitamina são produtos lácteos, carne, ovos, peixe e cereais fortificados, mas também pode ser obtida através de suplementos. É armazenada nos hepatócitos e libertada para o plasma quando necessário, sendo o excesso libertado pelo rim. Quando há um défice de ingestão desta vitamina, ela continua a ser excretada na bilis, mas passa a ser reabsorvida, continuando apta para as suas funções metabólicas. Considera-se um valor normal de vitamina B12 sérica entre 187 e 883 pg/mL. (Burtis *et al.*, 2008)

A vitamina B12, juntamente com derivados do ácido fólico, é necessária para a biossíntese do DNA. No ser humano, a vitamina B12 pode apresentar-se em duas formas, a forma de adenosilcobalamina, que funciona como coenzima na reação de conversão de metilmalonil CoA em succinil CoA (uma parte do ciclo do ácido cítrico), e a forma de metilcobalamina que funciona como coenzima na metilação da homocisteína em metionina (principal fonte de grupos metil no corpo humano). (Burtis *et al.*, 2008; Lee e Griffiths, 1985)

A deficiência de vitamina B12 pode provocar anemia megaloblástica, sendo a sua causa mais comum a anemia perniciosa, uma doença autoimune na qual ocorre um ataque da mucosa gástrica, levando a um atrofio do estômago. Este ataque é provocado por anticorpos contra

as células gástricas parietais, contra a H^+/K^+ -ATPase gástrica e contra o fator intrínseco (FI), fazendo com que a ligação da vitamina B12 ao FI seja inibida. Para além da anemia megaloblástica, a deficiência desta vitamina pode ter também como consequências neuropatia progressiva, esterilidade, atividade osteoblástica diminuída e defeitos no tubo neural no feto, entre outras. Assim, deve ser feito um controlo de rotina dos níveis de vitamina B12, assim como na gravidez. (Hofbrand e Moss, 2016)

b) Folato/ácido fólico

O folato/ácido fólico tem um papel importante na biossíntese do RNA e DNA e na reparação e metilação de DNA, reações essas que são fundamentais na manutenção da integridade do genoma e das células. (Burtis *et al.*, 2008; Milman, 2012)

O folato pode ser obtido através do consumo de espinafres e outros vegetais de folha verde, legumes, sumo de laranja, fígado e suplementos. (Burtis *et al.*, 2008)

A deficiência de folato pode dever-se a uma ausência de microrganismos intestinais ou a baixa absorção intestinal, consumo insuficiente, situações em que ocorra um aumento do consumo devido a uma rápida divisão e crescimento celular (como na gravidez, doença hepática e doenças malignas), administração de medicamentos anti-folato, terapia anti-convulsionante (aumenta a necessidade de folato) e mutações nas enzimas que metabolizam o folato. A maior manifestação desta deficiência é a anemia megaloblástica, mas também pode provocar diarreia, desordens comportamentais, entre outras. Um decréscimo dos níveis de folato podem provocar o aumento dos níveis de homocisteína no plasma (fator de risco para doença da artéria coronária e doença cerebral vascular), síntese deficiente de DNA e promover o desenvolvimento de cancro. (Burtis *et al.*, 2008; Milman, 2012)

Uma vez que o folato tem um papel fundamental na divisão celular e na síntese proteica, este é essencial para que ocorra um desenvolvimento correto na gravidez, sendo que a sua deficiência pode resultar em alterações na síntese de DNA e alterações cromossómicas. Assim, o doseamento de folato é uma análise que é normalmente realizada durante a gravidez, para, se necessário, fornecer suplementação. (Santos e Pereira, 2007)

O folato é doseado no soro com o objetivo de avaliar o consumo recente, mas também pode ser doseado no sangue total ou nos eritrócitos, avaliando as reservas do mesmo nos tecidos. Valores normais de folato sérico devem situar-se entre 3,0 a 20,5 ng/mL. (Burtis *et al.*, 2008)

c) **Vitamina D3 (25-hidroxitamina D)**

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel que se pode apresentar em duas formas bioequivalentes, a vitamina D2 (ergocalciferol), que é obtida através do consumo de vegetais e suplementos orais, e a vitamina D3 (colecalciferol), cuja produção é estimulada pela exposição da pele à radiação solar ultravioleta B (UVB), mas que também pode ser obtida através do consumo de peixes ricos em óleo, alguns alimentos fortificados (leite, sumos, margarinas, iogurtes, cereais e soja) e suplementos. Ambas as formas, uma vez absorvidas pelo intestino, são metabolizadas no fígado em 25-hidroxitamina D (25-OH D), sendo esta depois convertida, no rim, a 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol), que por sua vez estimula a absorção intestinal de cálcio. (Kennel, Drake e Hurley, 2010; Nair e Maseeh, 2012; Sizar e Givler, 2019)

A vitamina D é usada pelo corpo humano no desenvolvimento e manutenção dos ossos através da estimulação da absorção de cálcio, magnésio e fosfato. Para que se considere normal, o valor de 25-hidroxitamina D deve ser superior a 30 ng/mL. (Sizar e Givler, 2019)

A deficiência de vitamina D afeta pessoas no mundo inteiro e tem consequências como uma maior prevalência de raquitismo nas crianças e osteoporose nos adultos, isto porque ao diminuir a absorção de cálcio e fósforo vai ocorrer um aumento nos níveis de PTH, que tem um efeito osteoclástico, resultando na diminuição de densidade óssea. Esta deficiência deve-se principalmente a um estilo de vida que inclua poucas atividades no exterior e a fatores ambientais que diminuam a exposição à luz solar, como a poluição atmosférica. (Nair e Maseeh, 2012; Sizar e Givler, 2019)

A determinação de 25-OH D no soro é aconselhada quando se suspeita de deficiência de vitamina D. (Nair e Maseeh, 2012)

9.3.2.6. Insulina

A insulina é uma proteína produzida pelas células β dos ilhéus de Langerhans no pâncreas. Ela tem como função, juntamente com o glucagon e a epinefrina, manter os níveis de glucose no sangue. A proinsulina é a maior forma de armazenamento de insulina, tem uma baixa atividade biológica e encontra-se normalmente em concentrações muito baixas na corrente sanguínea. (Burtis *et al.*, 2008)

A insulina provoca um aumento da absorção da glucose pelas células. O glucagon estimula a produção de glucose pelo fígado e a sua secreção é regulada principalmente pela concentração de glucose no plasma, sendo que uma concentração baixa de glucose estimula a secreção de glucagon e uma concentração alta de glucose inibe a sua secreção. A insulina inibe tanto a libertação de glucagon do pâncreas como a sua biossíntese, assim, uma deficiência de

insulina provoca o aumento da concentração de glucagon na corrente sanguínea tendo como consequência hiperglicemia. Como o glucagon promove a cetogênese no fígado, um aumento na sua concentração leva à ocorrência de cetose, podendo chegar ao estado de cetoacidose. (Burtis *et al.*, 2008)

Os indivíduos com diabetes *mellitus* tipo I apresentam uma deficiência de insulina devido à perda de células β dos ilhéus de Langerhans, sendo então dependentes da administração da mesma, de forma a evitar concentrações demasiado elevadas de glucose na corrente sanguínea e a prevenir cetoacidose. (Burtis *et al.*, 2008)

Os indivíduos com diabetes *mellitus* do tipo II não têm como problema a deficiência de insulina mas sim o seu mecanismo de ação comprometido, tendo como consequência um decréscimo da resposta biológica a concentrações normais de insulina no plasma. (Burtis *et al.*, 2008)

A determinação da concentração de insulina é importante na monitorização de determinadas terapias, como o transplante de células β dos ilhéus de Langerhans ou transplante do pâncreas. Esta determinação também é feita para avaliar indivíduos com hipoglicemia em jejum e auxiliar na classificação do tipo de diabetes, sendo também importante na escolha da terapia inicial em indivíduos com diabetes *mellitus* do tipo I. A presença de uma concentração baixa de glucose no plasma em conjunto com níveis elevados de insulina é sugestivo de um tumor produtor de insulina nas células β dos ilhéus de Langerhans. Consideram-se valores normais de insulina, após jejum noturno em pessoas não obesas, de 12 a 150 pmol/L. (Burtis *et al.*, 2008)

9.4. Equipamento Olympus AU680

9.4.1. Modo de funcionamento do equipamento

O *Olympus AU680* tem como um dos seus princípios de funcionamento analíticos a espectrofotometria, que é uma técnica que usa luz para medir concentrações de determinados analitos. (Harris, 2010)

Para a quantificação do fator reumatoide, da proteína C reativa e do título de estreptolisina O este equipamento usa como método analítico a turbidimetria, que consiste na medição do decréscimo da intensidade da luz que passa através de uma solução que contenha partículas suspensas (nestes casos imunocomplexos), ou seja, quanto maior a quantidade de partículas suspensas menos luz é transmitida. (Harris, 2010)

9.4.2. Análises efetuadas no equipamento

9.4.2.1. Fator reumatoide

Os fatores reumatoides são auto-anticorpos com diferentes isótopos e afinidades. Os mais encontrados são, normalmente, IgM contra a região Fc da IgG, mas também existem isótopos IgG, IgA, IgE e IgD. (Ingegnoli, Castelli e Gualtierotti, 2013)

Vários fatores genéticos e ambientais levam a uma perda de tolerância a proteínas que contenham resíduos de citrulina, o que conduz à produção de auto-anticorpos, como anticorpos contra proteína/peptídeo citrulinado anticíclico (ACPA) e fator reumatoide. (Tiwari e Bergman, 2019)

O fator reumatoide (FR) é usado para o diagnóstico diferencial de artropatias, principalmente da artrite reumatoide, e para a escolha da terapêutica, mas também pode ser encontrado em indivíduos com outras doenças ou em indivíduos saudáveis. (Ingegnoli, Castelli e Gualtierotti, 2013) A artrite reumatoide é uma doença inflamatória progressiva, que na ausência de tratamento pode levar à destruição e disfunção das articulações. Assim, o seu diagnóstico precoce e tratamento numa fase inicial podem prevenir a deterioração das articulações e retardar a progressão da doença. (Heidari, 2011)

Em doenças não reumáticas, ao contrário do que acontece em indivíduos com artrite reumatoide, a produção de FR é transitória e estes são normalmente IgM polirreativas de baixa afinidade. (Ingegnoli, Castelli e Gualtierotti, 2013)

No caso de indivíduos saudáveis, os FR encontrados estão presentes em baixas concentrações, são IgM polirreativas e têm baixa afinidade. (Ingegnoli, Castelli e Gualtierotti, 2013)

Os FR também podem ser encontrados em indivíduos com doenças sistémicas autoimunes (lúpus sistémico eritematoso, doenças do tecido conectivo, entre outras). Os indivíduos com síndrome de Sjogren ou crioglobulinémia tipo II ou III são os que apresentam níveis mais elevados de FR, e normalmente os primeiros apresentam mais FR policlonais e os segundos mais FR monoclonais. (Ingegnoli, Castelli e Gualtierotti, 2013)

A reação de Waaler Rose tem como objetivo a deteção deste tipo de auto-anticorpos. A reação baseia-se na aglutinação de eritrócitos de ovelha, sensibilizados com IgG de coelho, quando em contacto com soro de indivíduos com este tipo de IgM, sendo que a técnica evoluiu de forma a substituir o uso de eritrócitos de ovelhas por partículas de latex. Esta reação tem sido substituída por técnicas como a nefelometria e os imunoensaios enzimáticos. (Ingegnoli, Castelli e Gualtierotti, 2013)

9.4.2.2. Doseamento da proteína C reativa

A proteína C reativa é uma proteína plasmática que tem uma elevada sensibilidade como marcador de inflamação. É considerada uma proteína de fase aguda positiva, ou seja, sofre um aumento de concentração plasmática em resposta a uma reação de fase aguda, sendo que uma reação de fase aguda é uma resposta não específica à inflamação (infecções e doenças autoimunes) ou a danos tecidulares (cirurgias, enfarte do miocárdio, tumores, entre outras). (Burtis *et al.*, 2008)

A determinação da proteína C reativa é útil na monitorização do estado de inflamação em doenças inflamatórias, na detecção de infecções em indivíduos com lúpus sistêmico eritematoso, com leucemia ou após cirurgias, na monitorização de septicemia e meningite em recém-nascidos e na monitorização da resposta ao tratamento. (Burtis *et al.*, 2008)

Visto que se considera normal um valor de proteína C reativa inferior a 0,05 mg/dL, a presença de proteína C reativa em concentrações persistentes acima desse valor está associada a um risco elevado de doença cardiovascular. (Salazar *et al.*, 2014)

9.4.2.3. Título de antiestreptolisina O

Streptococcus pyogenes é um estreptococo de Gram positivo, β -hemolítico do grupo A de Lancefield. Esta bactéria tem capacidade para produzir diversos fatores de virulência, o que leva a que seja responsável por diversas doenças no ser humano. Doenças essas que podem provocar sequelas graves como glomerulonefrite aguda ou febre reumática. (Fontaine, Lee e Kehoe, 2003)

A estreptolisina O é uma forte toxina citolítica, produzida por *Streptococcus pyogenes*, que se liga ao colesterol nas membranas celulares das células eucariotas, resultando na formação de largos poros transmembranares e tendo como consequência a lise celular e uma resposta imunológica no hospedeiro. (Fontaine, Lee e Kehoe, 2003; Sen e Ramanan, 2014)

A quantificação do título de antiestreptolisina O (TASO) é um teste utilizado para diagnosticar infecções recentes por *Streptococcus pyogenes*, assim como o seu estado de evolução. Considera-se normal um valor inferior a 200 UI/mL para pessoas com idade superior a 12 anos e um valor inferior a 150 UI/mL para pessoas com idade inferior a 12 anos. (GOODER, 1961; Prestes-Carneiro, Acêncio e Pompei, 2005)

9.5. Testes rápidos serológicos e em urina e fezes

Este é um setor dentro da área da imunologia que consiste na pesquisa de anticorpos ou antígenos em soro, urina e fezes, através da utilização de testes rápidos.

9.5.1. Teste para detecção da sífilis – Teste “Reagina Plasmática Rápida”

Treponema pallidum subespécie *pallidum* é um microrganismo em forma de espiroqueta responsável pela sífilis e transmitido por via sexual. (Garcia e Isenberg, 2007)

A sífilis pode ser transmitida verticalmente, ou seja, da mãe para o feto e as taxas de transmissão dependem do período da gravidez em que a mãe é infetada e do estágio em que se encontra a doença. A transmissão vertical desta doença pode ou não ter consequências, havendo a possibilidade de resultar em parto prematuro, baixo peso da criança e até mesmo em aborto. Por isso, é importante fazer o rastreio da doença em mulheres grávidas ou que pretendam engravidar. (Garcia e Isenberg, 2007)

Em algumas pessoas que não receberam tratamento, a sífilis pode manifestar-se de uma forma tardia, que se pode dividir em sífilis benigna, sífilis cardiovascular e neurosífilis (esta manifestação pode ocorrer em qualquer estágio da sífilis). A presença de glóbulos brancos (nível superior a 5 glóbulos brancos por mL) e proteínas (nível superior a 50 mg por dL) no fluido cérebrospinal podem ser a única indicação de neurosífilis. (Garcia e Isenberg, 2007)

O diagnóstico serológico da sífilis faz-se habitualmente através de um teste treponémico para screening (como o ensaio de hemaglutinação de *Treponema pallidum*), que usa antigénios de *Treponema pallidum* ou antigénios clonados de *Treponema pallidum*, seguido de um teste não treponémico, que utiliza um antigénio à base de cardiolipina e deteta anticorpos anti-cardiolipina IgG e IgM. Esses anticorpos são produzidos em resposta aos lípidos presentes na membrana externa da espiroqueta ou contra a cardiolipina do hospedeiro, devido tanto à destruição da espiroqueta como a doenças autoimunes, infeções virais recentes, entre outras, e são detetados através de floculação, que se pode apresentar tanto microscopicamente como macroscopicamente. (Garcia e Isenberg, 2007)

Se não for tratada, esta doença passa por diversos estágios cujos testes serológicos começam a ter resultados “reativos” no primeiro ano, quando a doença passa ao estado de latência. À medida que o estado de latência avança é possível que os testes não treponémicos passem a “não reativos”, enquanto os treponémicos permanecem “reativos”. (Garcia e Isenberg, 2007; Larsen, Steiner e Rudolph, 1995)

No Coimbralab o teste efetuado para o diagnóstico da sífilis é o teste da reagina plasmática rápida (RPR), que é um dos testes não treponémicos mais usados. É feito numa carta de teste com vários círculos, onde se colocam 50 µL de soro (amostra a testar) e uma gota de reagente, que contém partículas de carvão ligadas ao antigénio (antigénio *Veneral Disease Research Laboratory* - VDRL). Estas partículas ficam aprisionadas no complexo de antigénio-anticorpo que se forma, permitindo que os agregados sejam observados

macroscopicamente em soros “reativos”. É depois realizado um método semi-quantitativo, que consiste em fazer diluições sucessivas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, e assim sucessivamente) de um determinado volume do soro do doente, de forma a avaliar a reatividade do mesmo, com a suspensão de partículas de carvão ativado ligadas ao antigénio, em cada diluição. (Garcia e Isenberg, 2007) Nas Figuras 1 e 2 pode observar-se o método semi-quantitativo do RPR com positividade até à diluição 1/32 na Figura 1 e até à diluição 1/64 na Figura 2.

O RPR apresenta algumas limitações: o resultado do teste pode ser “não reativo” em indivíduos com sífilis latente ou sífilis tardia; os níveis de reatividade do teste podem ser baixos em indivíduos que foram tratados num estado tardio da sífilis ou numa fase latente tardia e em indivíduos com histórico de infeções por sífilis; falsos positivos podem ocorrer em diversas situações, tais como em indivíduos que usam elevadas quantidades de drogas, em indivíduos com HIV, mononucleose, malária, entre outras; em indivíduos com elevadas concentrações do anticorpo pesquisado neste teste, se a amostra não for diluída, devido ao excesso de anticorpo pode não ocorrer aglutinação, originando resultados “não reativos” ou “fracamente reativos”. (Garcia e Isenberg, 2007)

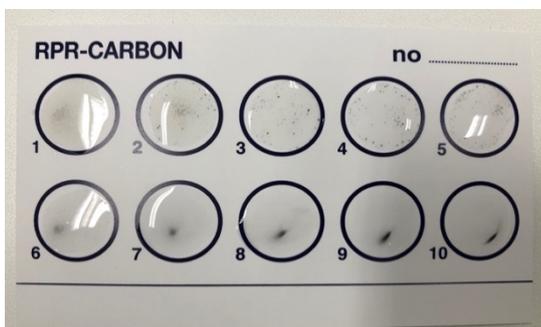


Figura 1 – Teste da reagina plasmática rápida semi-quantitativo com positividade até à diluição 1/32 (nº 6)

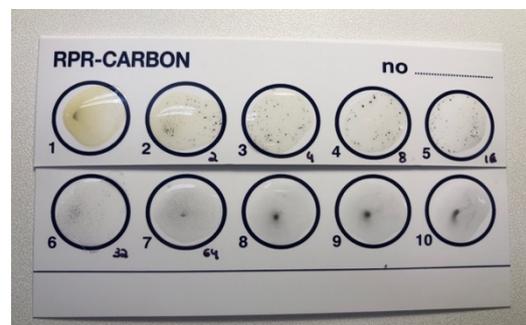


Figura 2 – Teste da reagina plasmática rápida semi-quantitativo com positividade até à diluição 1/64 (nº 7)

9.5.2. Teste para deteção da mononucleose – Reação de Paul-Bunnell

O vírus Epstein-Barr (EBV) pertence à família *Herpesviridae* e é o responsável pela mononucleose infecciosa, sendo os dois tipos mais comuns deste vírus o EBV-1 (tipo A) e o EBV-2 (tipo B). A mononucleose infecciosa pode ser assintomática ou manifestar-se através de febre, mal-estar, faringites e esplenomegalia, que podem durar desde alguns dias a semanas. Normalmente esta é uma doença autolimitada, mas que em alguns casos pode provocar complicações com sintomas neurológicos, hematológicos ou psicológicos e à qual é

frequentemente associada hepatite, cuja ocorrência pode ser verificada através de realização de testes de avaliação da função hepática. (Ahmad *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2010; Mule *et al.*, 2018)

Depois de inoculado o vírus, a sua replicação ocorre nas células epiteliais da nasofaringe e em células B na orofaringe. O EBV propaga-se no corpo humano através de células B infectadas. Apenas as células B humanas e as de alguns primatas contêm recetores (moléculas CD 21) para este vírus. Após infeção dos linfócitos B o vírus pode ficar latente dentro dos mesmos, que irão então sofrer modificações. O vírus ativa os linfócitos B, resultando na produção policlonal de diversos anticorpos, principalmente IgM. O EBV pode também provocar infeção lítica, com morte celular e libertação de viriões. (Greenwood *et al.*, 2012; Hess, 2004; Mule *et al.*, 2018)

As células mononucleares atípicas (linfócitos atípicos) presentes em indivíduos com mononucleose infecciosa são células T reativas à infeção por EBV. A proliferação destas células faz com que o quadro clínico se assemelhe ao de leucemia linfocítica. Estes linfócitos atípicos aparecem com o início dos sintomas e desaparecem com a resolução da doença. (Ahmad *et al.*, 2014; Greenwood *et al.*, 2012; Hess, 2004; Mule *et al.*, 2018)

A resposta imunológica nesta infeção começa com IgM contra antígenos da cápside do vírus (VCA), que persistem durante alguns meses, enquanto os anticorpos contra os antígenos nucleares do vírus só aparecem numa fase convalescente tardia, provavelmente depois de ocorrer a libertação do vírus quando as células B infectadas são destruídas. (Greenwood *et al.*, 2012)

O antígeno Paul-Bunnell está presente em eritrócitos de várias espécies de mamíferos. Os anticorpos heterófilos anti-Paul-Bunnell provocam aglutinação ou hemólise dos eritrócitos que contêm este antígeno, sendo o EBV um dos grandes responsáveis pela positividade de anticorpos heterófilos no soro. Estes anticorpos podem ser detetados através de um teste rápido de aglutinação. (Golaszewska *et al.*, 2003; Greenwood *et al.*, 2012)

A reação de Paul-Bunnell é o teste serológico mais utilizado no diagnóstico da mononucleose infecciosa. A reação original tem por base a deteção de anticorpos heterófilos, no soro de um indivíduo infectado, por aglutinação de eritrócitos de cavalo ou ovelha. (Mule *et al.*, 2018)

O teste utilizado no Coimbralab baseia-se na reação de Paul-Bunnell-Davidsohn, que utiliza eritrócitos de carneiro ou de bovino como antígenos para a deteção de anticorpos heterófilos. Este teste tem como reagente partículas de latex ligadas a um antígeno (eritrócitos de bovino ou carneiro) e ao juntar este reagente ao soro de indivíduos com mononucleose infecciosa ocorre aglutinação. (Cook *et al.*, 1987; Guemra *et al.*, 2008)

9.5.3. Teste para o rastreio da febre tifóide – Reação de Widal

O teste rápido utilizado para o rastreio da febre tifóide (*Salmonella typhi*) é baseado na reação de Widal e é utilizado em zonas não endémicas, em indivíduos não vacinados e que não estão habitualmente expostos à mesma, sendo que o procedimento de diagnóstico definitivo consiste no isolamento de *Salmonella typhi* em amostras biológicas de fezes ou sangue. (Bhalla, 2014; HOFFMAN *et al.*, 1986; Schroeder, 1968)

Na reação de Widal são utilizados antígenos comerciais para a deteção de anticorpos de aglutinação contra os antígenos O e H de *Salmonella typhi*. O antígeno O é preparado a partir da membrana celular da bactéria, enquanto o antígeno H é proveniente dos flagelos da bactéria. É também utilizado o antígeno Vi, que provém de uma estrutura termolábil presente na membrana celular, para identificação de portadores de *Salmonella typhi*. (HOFFMAN *et al.*, 1986; Schroeder, 1968; Senewiratne e Senewiratne, 1977)

Os antígenos O e H podem estar presentes em muitas outras espécies de *Salmonella* e podem também existir antígenos proteicos que sofrem reações cruzadas com os reagentes, resultando em falsos positivos. Assim, este teste é especialmente útil em crianças com sintomas clínicos consistentes com febre tifóide, sendo que se o resultado for negativo exclui a presença desta doença evitando a administração desnecessária de antibiótico. (HOFFMAN *et al.*, 1986; Senewiratne e Senewiratne, 1977)

O teste realiza-se numa placa, que pode ser de vidro, com vários círculos, que permita observar se ocorre ou não aglutinação nas amostras positivas. Para o teste qualitativo é colocada uma gota de soro em cada círculo, sendo depois adicionado um reagente diferente em cada um, sendo que cada reagente pesquisa um anticorpo. Se houver aglutinação deve-se então prosseguir para o teste semi-quantitativo, utilizando diluições de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320. (HOFFMAN *et al.*, 1986)

9.5.4. Teste para deteção de doenças provocadas por bactérias do género *Rickettsia* – Teste de aglutinação Weil-Felix

O teste de aglutinação Weil-Felix é utilizado para o diagnóstico de doenças provocadas por bactérias do género *Rickettsia*. (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015) Este género divide-se em dois grupos: grupo do tifo (*Rickettsia prowazekii* – agente do tifo epidémico, transmitido pelo piolho do corpo; *Rickettsia typhi* – agente do tifo murino/endémico, transmitido pela pulga do rato) e o grupo das febres exantemáticas (cerca de 15 outras espécies patogénicas de *Rickettsia*, transmitidas por diferentes artrópodes como ácaros e carraças). Estas bactérias apresentam-se normalmente na forma de cocobacilos e são intracelulares obrigatórias,

colonizam o citoplasma mas têm também a capacidade de invadir e de se multiplicarem no núcleo das células hospedeiras. As *Rickettsia* são inoculadas na derme do hospedeiro, invadem os nódulos linfáticos e espalham-se depois pela corrente sanguínea, infectando as células endoteliais dos vasos sanguíneos (principais células-alvo), sendo que os danos causados nestas células levam a um aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo perda de fluidos para o espaço intersticial, o que pode ter como consequência a diminuição da perfusão de diversos órgãos, comprometendo o seu funcionamento. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

Os anticorpos contra esta bactéria começam a aparecer na segunda semana da infeção, o que significa que os testes serológicos não servem para o diagnóstico precoce da doença, mas apenas para confirmação de diagnóstico em determinados casos, como em estudos epidemiológicos. (Greenwood *et al.*, 2012)

O teste de aglutinação Weil-Felix utiliza como reagente antígenos de *Proteus* (OX-2, OX-19 e OX-K), que ao sofrerem uma reação cruzada com os anticorpos contra *Rickettsia* aglutinam. Este teste é pouco sensível e específico, pelo que atualmente se recomenda o uso de outras técnicas como imunofluorescência e ensaios enzimáticos. (Garcia e Isenberg, 2007; Murray *et al.*, 2007)

9.5.5. Teste para deteção da brucelose – Reação de Wright

A brucelose é uma doença infecciosa sistémica, cujo agente etiológico é o género *Brucella* (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*), um bacilo de Gram negativo. Esta doença apresenta diversas manifestações clínicas, entre elas: febre, cansaço, suores, perda de apetite e de peso, artralgias, mialgias, dores lombares, dores de cabeça, esplenomegalia, hepatomegalia e arterites. (Mert *et al.*, 2003)

O teste rápido usado para a deteção de *Brucella* baseia-se na reação de Wright, que deteta anticorpos aglutinantes, principalmente da classe IgM. Este teste é efetuado numa placa de vidro com vários círculos e em cada círculo é colocado um determinado volume de soro do utente, usando-se volumes decrescentes. Depois adiciona-se uma gota de reagente (que contém antígenos de *Brucella*), obtendo-se diluições de 1/20, 1/40, 1/160 e 1/360, sendo positivos todos os círculos em que ocorra aglutinação, que resulta da reação entre os anticorpos contra *Brucella* presentes no soro do utente e os antígenos presentes no reagente. (Cox, 1968)

9.5.6. Teste imunológico de gravidez

O teste imunológico de gravidez é um teste sensível para a deteção de gonadotrofina coriónica humana (HcG) na urina. Este é um ensaio imunocromatográfico que utiliza uma cassette com uma membrana de nitrocelulose e dois anticorpos contra a HcG, o primeiro contra a cadeia α e o segundo contra a cadeia β . O primeiro anticorpo anti-HcG encontra-se marcado com um corante e fica suspenso quando se adiciona a amostra de urina à cassette, ligando-se depois à HcG, resultando essa ligação num complexo. O segundo anticorpo anti-HcG encontra-se fixo na linha de teste fazendo com que, ao ocorrer a ligação com a HcG previamente complexada com o primeiro anticorpo, se forme uma linha corada. Existe também a linha de controlo onde fica aprisionado o anticorpo marcado com um corante que não se ligou à HcG, sendo esta sempre positiva. (Gronowski, 2004)

9.5.7. Teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes

Tal como o nome indica o teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes (FOBT) faz-se com o objetivo de pesquisar sangue nas fezes que não é visível macroscopicamente, principalmente para auxiliar no diagnóstico de cancro do colo-retal. (Kościelniak-Merak *et al.*, 2018)

O FOBT utilizado no Coimbralab é um teste imunocromatográfico (qualitativo) que usa anticorpos específicos para detetar a hemoglobina. Para a realização deste teste a amostra deve ser colhida de vários locais das fezes obtidas após defecação e depois diluída na solução fornecida no *kit* de reagentes para posterior aplicação na cassette de imunocromatografia. (Kościelniak-Merak *et al.*, 2018)

A cassette do teste imunocromatográfico de pesquisa de sangue oculto nas fezes é constituída por uma membrana que possui anticorpos policlonais anti-hemoglobina conjugados com ouro coloidal na área de aplicação da amostra; imobilizados na linha de teste encontram-se anticorpos monoclonais anti-hemoglobina e na linha de controlo anticorpos contra os anticorpos conjugados, de forma a que o excesso dos mesmos fique aprisionado formando uma linha colorida. Desta forma, quando existir sangue nas fezes irão aparecer duas linhas coloridas, sendo que a linha de controlo tem que ser sempre positiva, caso contrário o teste deve ser rejeitado. (Longo *et al.*, 2011)

10. Microbiologia

10.1. Amostras

As amostras mais analisadas neste setor são: urina, fezes, exsudatos nasofaríngeo, vaginal, uretral e retal e pús.

A amostra de urina ocasional é a mais utilizada neste setor. Para uma colheita correta com o mínimo de contaminações a área urogenital deve ser higienizada e a primeira porção de urina deve ser descartada, sendo depois colhido para um frasco esterilizado o jato de urina intermédio. (Clarridge, Jonhson e Pezzlo, 1998)

As amostras de fezes, após serem colhidas devem ser transportadas o mais rápido possível, uma vez que com o passar do tempo as fezes vão sofrendo alterações, como a descida de pH, podendo levar à morte dos microrganismos presentes nas mesmas. Se não houver a possibilidade de entrega imediata no laboratório a amostra deve ser refrigerada. (Struthers et al., 2012)

As amostras uretrais devem ser colhidas com uma zaragatoa de diâmetro estreito, sendo esta inserida entre 3 a 4 cm na uretra e gentilmente rodada antes de ser retirada. (Vandepitte et al., 2003)

As amostras retais devem ser colhidas com uma zaragatoa, sendo esta inserida entre 4 a 5 cm no canal anal. (Vandepitte et al., 2003)

As amostras vaginais devem ser colhidas com uma zaragatoa, sendo esta inserida no canal cervical e rodada durante pelo menos 10 segundos antes de ser retirada. (Vandepitte et al., 2003)

O exsudato nasofaríngeo deve ser colhido com uma zaragatoa, sendo esta introduzida na narina paralelamente ao palato, devendo ficar durante alguns segundos nessa posição e depois introduzir um pouco mais fundo e rodar ligeiramente. (Andrade, 2006)

10.2. Controlo de qualidade

10.2.1. Controlo de qualidade interno

Neste setor é efetuado um controlo semanal de esterilidade da solução salina, utilizada para as suspensões bacterianas utilizadas no equipamento Vitek II Compact.

Relativamente ao equipamento Vitek II Compact efetua-se apenas uma manutenção semanal de limpeza do sistema ótico.

10.2.2. Controlo de qualidade externo

Na microbiologia existe um plano de controlo trimestral para a bacteriologia e um plano de controlo quadrimestral para a parasitologia.

Para o controlo da bacteriologia são analisadas duas amostras: uma em que se efetua apenas uma coloração de Gram e outra para efetuar todo o procedimento de identificação bacteriana e avaliação da sensibilidade aos antibióticos.

Na parasitologia realiza-se a identificação morfológica parasitária em duas amostras de fezes e duas amostras de sangue. Estas amostras são acompanhadas de uma história clínica (sinais, sintomas, viagens recentes, etc.) que ajuda na interpretação das mesmas.

10.3. Testes rápidos de pesquisa de *Streptococcus*

Os testes rápidos de pesquisa de *Streptococcus* são testes imunocromatográficos de deteção de antigénios. Nestes testes é utilizada uma cassette de plástico que contém uma membrana na qual é aplicada uma linha fixa de anticorpos de coelho específicos do antigénio que se pretende detetar (linha de teste). Antes da linha de teste estão presentes anticorpos de coelho específicos do antigénio a detetar, marcados com uma tinta e a seguir à linha de teste existe a linha de controlo, que é constituída por anticorpos de cabra contra os anticorpos marcados com a tinta. (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015)

A amostra deve ser colocada em contacto com um diluente que é depois transferido para a cassette de imunocromatografia. O diluente vai migrar na membrana, fazendo com que os anticorpos marcados fiquem suspensos, e o antigénio que se pretende detetar, se estiver presente vai ligar-se aos anticorpos suspensos e aos anticorpos da linha de teste, formando uma linha corada. (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015)

Os anticorpos da linha de controlo não capturam os anticorpos marcados que não se ligaram ao antigénio, formando outra linha corada. Esta linha deve sempre ser positiva, caso contrário, a cassette deve ser rejeitada. (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015)

a) Pesquisa de *Streptococcus* do grupo A

Streptococcus pyogenes é um coco de Gram positivo pertencente ao grupo A de Lancefield, sendo esta espécie a de maior importância clínica do grupo. Esta bactéria tem a capacidade de colonizar a orofaringe e a pele, causando diversos tipos de infeção: infeções superficiais ou não invasivas, infeções profundas ou invasivas, infeções mediadas por toxinas e infeções resultantes de distúrbios imunológicos. Durante a infeção pode ocorrer produção de pús e esta pode também deixar sequelas. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

As duas manifestações mais comuns provocadas por *Streptococcus* do grupo A são a faringite bacteriana e a amigdalite, sendo estas mais frequentes nas crianças entre os 5 anos e os 15 anos. (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015)

A amostra para a pesquisa de *Streptococcus* do grupo A deve ser colhida com uma zaragatoa, na zona da faringe posterior e na área das amígdalas, tocando também no exsudato se este estiver presente. A língua e a úvula devem ser evitadas. (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015)

Neste caso, a observação da coloração de Gram tem pouco significado clínico, porque o trato respiratório superior é colonizado por uma grande variabilidade de cocos de Gram positivo. (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015)

A pesquisa desta bactéria pode ser feita através de um teste rápido de detecção do antígeno estreptocócico do grupo A.

b) Pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B

Streptococcus agalactiae é uma bactéria pertencente ao grupo B de Lancefield que está normalmente presente na microbiota intestinal e do trato urogenital, podendo também colonizar o trato respiratório superior. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

É importante fazer a pesquisa deste microrganismo na mulher grávida, isto porque pode causar tanto infecções não invasivas durante e após a gravidez (infecções do trato urinário, endometrite, etc.), bem como infecções invasivas (sépsis), apesar de estas serem menos comuns. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

No recém-nascido, *Streptococcus agalactiae* pode provocar infecções precoces resultantes da ascensão da bactéria presente no trato urogenital da mãe para o líquido amniótico ou do nascimento, na passagem pelo canal de parto. Este tipo de infecção é normalmente manifestada na forma de sepsis, pneumonia, meningite, osteomielite ou artrite séptica. Para além da infecção precoce, esta bactéria pode também originar uma infecção tardia, sendo que neste caso a bactéria é geralmente adquirida nosocomialmente. (Barroso, Meliço-Silvestre e Taveira, 2014)

O diagnóstico nas grávidas é efetuado entre as 35 e 37 semanas de gestação. A amostra utilizada na realização do teste rápido (método imunocromatográfico) é colhida com uma zaragatoa, na zona vaginal e retal. Esta pode também ser semeada num meio cromogénico e fazer-se a posterior identificação de colónias suspeitas. (Centers for Disease Control and Prevention, 1996)

10.4. Inoculação das amostras e interpretação dos resultados

O processamento da maioria das amostras que chegam a este setor passa pela execução de uma coloração de Gram e pela sua inoculação num meio de cultura, o qual é posteriormente, respeitando o tempo de incubação de cada meio, analisado para verificar se houve ou não crescimento de bactérias ou fungos.

Na urocultura é utilizada a classificação do crescimento bacteriano entre 10^2 a 10^6 unidades formadoras de colónias (UFCs), sendo que se considera infeção urinária a partir de 10^5 UFCs. Se a placa contiver colónias de três ou mais bactérias diferentes, com crescimento significativo (a partir de 10^3 UFCs) considera-se “flora polimicrobiana”.

Nas outras amostras biológicas o crescimento bacteriano não é quantificado, sendo valorizadas as espécies patogénicas que crescem nos meios de pesquisa das mesmas, tendo em conta o tipo de amostra e o local da colheita.

A observação do Gram é especialmente importante nos exsudatos vaginais para pesquisa de *Gardnerella vaginalis*, que é um microrganismo que faz parte da microbiota urogenital feminina e da microbiota anorretal em ambos os sexos, mas também se associa a vaginoses. Na presença de infeção causada por esta bactéria, quando se observa a coloração de Gram estão normalmente presentes as chamadas “clue cells”, que são células do epitélio vaginal cobertas de bacilos de Gram variável. Nestes casos as secreções vaginais têm um cheiro característico a peixe e o seu pH é superior a 4,5 (pH normal das secreções vaginais é inferior a 4,5). (Brooks *et al.*, 2007)

10.4.1. Tipos de meios de cultura

a) Meios de cultura não seletivos

Os meios de cultura de utilização comum permitem detetar a maioria dos microrganismos aeróbios e aeróbios facultativos. (Murray *et al.*, 2007)

b) Meios de cultura de enriquecimento

Os meios de cultura de enriquecimento permitem o crescimento de microrganismos fastidiosos, que não crescem tão facilmente nos outros meios. A Gelose Columbia + 5 % de sangue de carneiro, assim como a gelose Campyloset são exemplos para esta categoria de meios de cultura. (Murray *et al.*, 2007)

c) Meios de cultura seletivos

Os meios de cultura seletivos favorecem a detecção de determinados microrganismos, através da inibição do crescimento de outros, por meio de certos aditivos (corantes, antibióticos). A gelose MacConkey, a gelose Hektoen e a gelose Campyloset são exemplos de meios de cultura seletivos. (Murray *et al.*, 2007)

d) Meios de cultura diferenciais

Os meios de cultura diferenciais permitem identificar os microrganismos através da aparência que adquirem no meio (cor, formação de precipitados). Os meios cromogênicos, como o chromID CPS Elite, são um exemplo desta categoria, assim como a gelose MacConkey e a gelose Hektoen. (Murray *et al.*, 2007)

e) Meios de cultura especializados

Este tipo de meio de cultura é específico para um determinado microrganismo patogênico. (Murray *et al.*, 2007)

10.4.2. Urocultura

A gelose chromID CPS Elite (CPSE) da Biomérieux é um meio de cultura diferencial para identificação da maioria das bactérias responsáveis por infecções do trato urinário. A inoculação do mesmo é feita da forma recomendada pela Biomérieux, com uma ansa calibrada de 10 μ L, fazendo-se uma estria do início ao fim da placa e depois espalhando o produto por toda a placa fazendo estrias perpendiculares à primeira, sendo este um método semi-quantitativo. Este meio de cultura deve permanecer na estufa a 37 °C durante 18 a 24 horas. Esta gelose é constituída por várias peptonas e substratos cromogênicos que permitem a detecção de atividade enzimática específica, sendo que cada bactéria adquire uma cor específica, facilitando a identificação da mesma. Esta gelose contém também L-triptofano, um substrato que é convertido por diversas bactérias em água e indol, ou seja, certas bactérias, como *Escherichia coli* têm a capacidade de converter o aminoácido triptofano em indol, através da enzima triptofanase. Os substratos que originam indol dão origem a várias cores (azul a vermelho), que dependem dos substituintes no anel de indol. (Benson, 2001; Mazoyer *et al.*, 1995; Orenge *et al.*, 2009)

Para que as bactérias sejam fermentadoras da lactose devem possuir duas enzimas, a β -galactosidase permease, proteína que transporta a lactose através da membrana, e a β -galactosidase, que degrada a β -D-lactose em β -glicose e β -galactose. O o-nitrofenil- β -

galactopiranosídeo (ONPG) é um substrato cromogénico, que substitui o uso de β -D-lactose, que tem a capacidade de penetrar a membrana sem a intervenção da β -galactosidase permease, assim todas as bactérias que possuem a β -galactosidase têm capacidade para degradar o ONPG, libertando o o-nitrofenol, que possui uma cor amarela em pH alcalino. (Vermelho *et al.*, 2006)

Escherichia coli é produtora de indol e as estirpes que expressam atividade de β -glucuronidase e/ou β -galactosidase, quando incorporadas neste meio, adquirem coloração de tom vermelho a carmim, enquanto as que não têm essa atividade apresentam um tom rosa claro a rosa. (Monget *et al.*, 2008; Orenge *et al.*, 2009) A β -D-glucuronidase é uma enzima produzida pela maioria das estirpes de *Escherichia coli*, sendo então útil na identificação desta bactéria. (Martins Perin *et al.*, 2010)

As estirpes de *Enterococcus* produtoras de β -glucosidase adquirem uma coloração turquesa. (Mazoyer *et al.*, 1995) A β -D-glucosidase é uma enzima produzida por alguns microrganismos pertencentes à microbiota intestinal, nomeadamente por *Enterococcus faecalis*. (Mroczyńska e Libudzisz, 2010)

As bactérias dos géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*, cujas estirpes são produtoras de β -glucosidase, adquirem uma coloração entre verde-azulado a cinzento-azulado. (Raafat, Dwedar e El-Seidi, 2015)

As estirpes de *Proteus* produtoras de triptofano desaminase adquirem uma coloração acastanhada, acompanhada por um escurecimento da cor do meio. (Mazoyer *et al.*, 1995)

As colónias de *Staphylococcus saprophyticus* adquirem uma coloração rosa opaca e as de *Streptococcus agalactiae* violeta-azulado. (Raafat, Dwedar e El-Seidi, 2015) No caso da urocultura de uma grávida, se houver crescimento de *Streptococcus agalactiae*, mesmo que se trate apenas de uma colónia, este tem que ser valorizado devido aos danos que pode causar no feto, como já foi referido no ponto 10.3-b).

As colónias de *Pseudomonas* spp. não adquirem coloração específica, mas têm um cheiro característico a “sumo de uva”. (Koneman *et al.*, 1997)

10.4.2.1. Interpretação das placas

A *Escherichia coli* é um dos microrganismos patogénicos que mais provoca infeções urinárias, nas Figuras 3, 4, 5 e 6 podem observar-se colónias desta bactéria com diferentes tons de coloração.

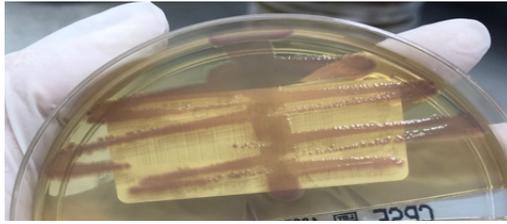


Figura 3 – Placa de gelose CPSE com colônias de *Escherichia coli*

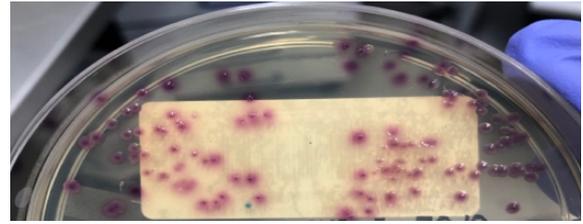


Figura 4 – Placa de gelose CPSE com colônias de *Escherichia coli* e uma colônia de *Enterococcus faecalis*

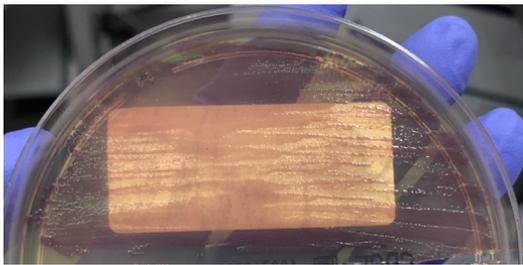


Figura 5 – Placa de gelose CPSE com colônias de *Escherichia coli*

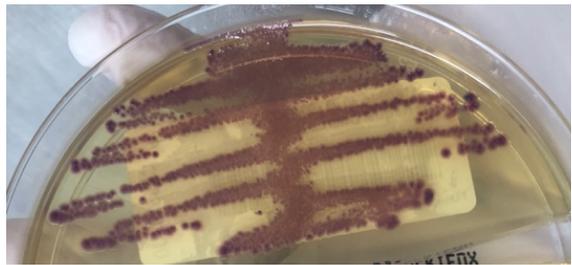


Figura 6 – Placa de gelose CPSE com colônias de *Escherichia coli*

Na Figuras 7 e 8 podem ser observadas duas placas cobertas de colônias de *Proteus mirabilis*.

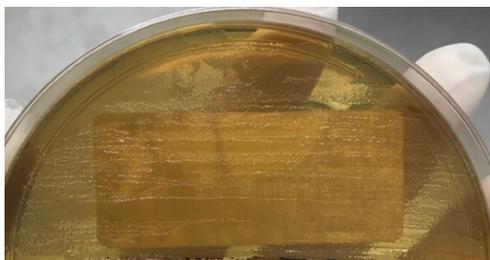


Figura 7 – Placa de gelose CPSE com colônias de *Proteus mirabilis*

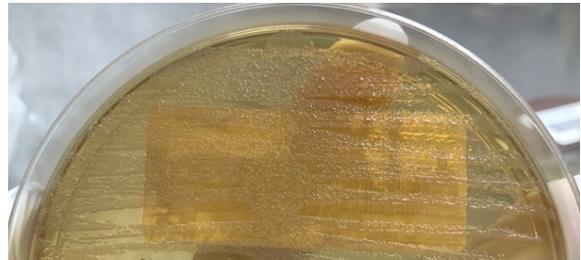


Figura 8 – Placa de gelose CPSE com colônias de *Proteus mirabilis*

Nas Figuras 9 e 10 podem observar-se colônias de *Klebsiella* spp., que têm como principal característica aspecto mucoso, para as quais foi depois efetuada uma identificação da espécie.

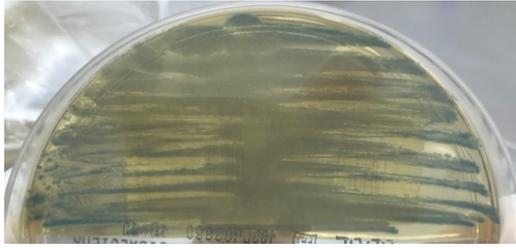


Figura 9 – Placa de gelose CPSE com colónias de *Klebsiella* spp.



Figura 10 – Placa de gelose CPSE com colónias de *Klebsiella* spp.

Na Figura 11 podem ser observadas colónias de *Pseudomonas* spp., que sofreram posterior identificação da espécie e na Figura 12 podem ser observadas colónias suspeitas de *Klebsiella*, mas que após identificação se concluiu que se tratavam de colónias de *Citrobacter koseri*.



Figura 11 – Placa de gelose CPSE com colónias de *Pseudomonas* spp.

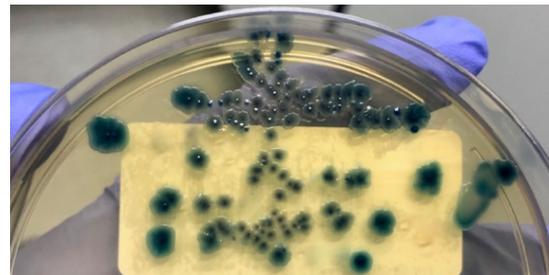


Figura 12 – Placa de gelose CPSE com colónias de *Citrobacter koseri*

Na Figura 13 podem observar-se colónias de *Enterococcus faecalis*.

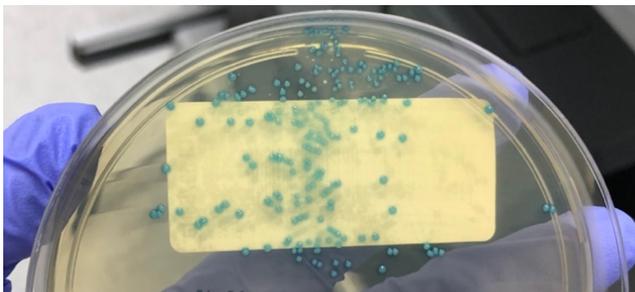


Figura 13 – Placa de gelose CPSE com colónias de *Enterococcus faecalis*

Na Figura 14 podem ser observadas colónias de *Staphylococcus saprophyticus* e na Figura 15 colónias de *Streptococcus agalactiae*, que foi isolado da urocultura de uma mulher grávida.

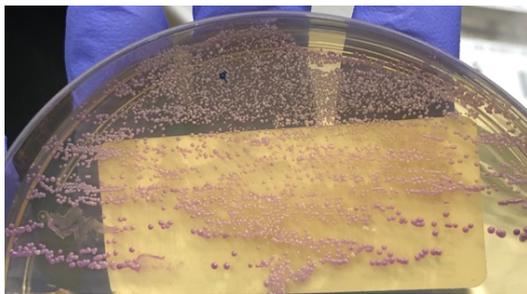


Figura 14 – Placa de gelose CPSE com colónias de *Staphylococcus saprophyticus*

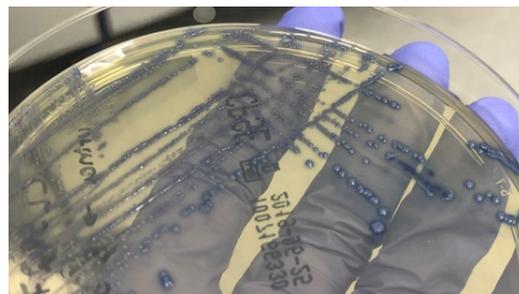


Figura 15 – Placa de gelose CPSE com colónias de *Streptococcus agalactiae*

10.4.3. Inoculação de exsudatos

Para a inoculação destas amostras utilizam-se vários meios da Biomérieux: Gelose Columbia + 5 % de sangue de carneiro (COS), Gelose MacConkey (MCK), Gelose Chocolate PolyViteX (PVX) e Gelose chromID Candida (CAN2). Os meios COS e MCK são incubados a 37 °C durante 24 horas, enquanto o CAN e o PVX permanecem na estufa durante 48 horas, sendo que o PVX deve ser incubado em anaerobiose. É também preparada uma coloração de Gram de cada amostra para facilitar a identificação.

Nos exsudatos vaginal e uretral, para além da coloração de Gram é também efetuada a contagem de leucócitos/eritrócitos/células presentes na amostra, assim como a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*.

A gelose MCK é um meio de cultura seletivo e diferencial usado para o isolamento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e outras de Gram negativo. Este meio inibe o crescimento de bactérias de Gram positivo (especialmente enterococos e estafilococos) devido à presença de sais biliares e cristal violeta. Para além disso, contém lactose, o que permite diferenciar colónias fermentadoras, que apresentam uma coloração rosa ou vermelha e podem estar rodeadas de precipitado de bilis, de colónias não fermentadoras, que não apresentam coloração. Isto ocorre porque a fermentação da lactose resulta na produção de ácido, fazendo com que o corante vermelho neutro, previamente absorvido pelas colónias, mantenha a sua coloração vermelha e podendo também provocar a insolubilização dos sais biliares. (Garcia e Isenberg, 2007; Murray *et al.*, 2007)

A gelose COS é um meio com base de gelose de Columbia enriquecido com 5 % de sangue de ovelha. A gelose Columbia é um meio nutritivo que contém peptonas derivadas da caseína e da carne, extratos de leveduras e amido de milho. É utilizado para promover o crescimento de diversos microrganismos aeróbios e anaeróbios encontrados em amostras biológicas. O enriquecimento com sangue de ovelha promove o crescimento de

microrganismos fastidiosos e permite a detecção de reações hemolíticas. Para além disso, o sangue de ovelha vai providenciar o fator X (heme), que é um fator de crescimento, mas não o fator V (dinucleótido nicotinamida adenina - NAD), pois este é destruído pela enzima NADase presente no sangue. (Ahmad *et al.*, 2014; Garcia e Isenberg, 2007; Murray *et al.*, 2007)

A gelose PVX é um meio que permite isolar bactérias de crescimento fastidioso pertencentes aos géneros *Neisseria* e *Haemophilus*. (Atlas, 2010) O suplemento de enriquecimento PolyVitex é equivalente ao IsoVitalex, fornecendo os fatores de crescimento fator X e fator V essenciais para o crescimento de bactérias do género *Haemophilus*, cujas colónias apresentam uma cor cinzenta-acastanhada. (Brooks *et al.*, 2007; Vandepitte *et al.*, 2003)

A gelose CAN2 é um meio cromogénico para identificação de espécies de *Candida*. A identificação é efetuada através da observação da coloração que as colónias adquirem, dividindo-se estas em colónias azuis (*Candida albicans*), colónias cor-de-rosa (*Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr* e *Candida lusitanae*) e colónias brancas (outras espécies de *Candida* – *Candida* spp.). A diferença na coloração das colónias deve-se a diferentes atividades enzimáticas entre as espécies de *Candida*. (Eraso *et al.*, 2006; Willinger *et al.*, 2001)

10.4.3.1. Interpretação das placas

Na Figura 16 podem observar-se colónias de bactérias fermentadoras da lactose e na Figura 17 colónias de bactérias não fermentadoras da lactose e fermentadoras da lactose.

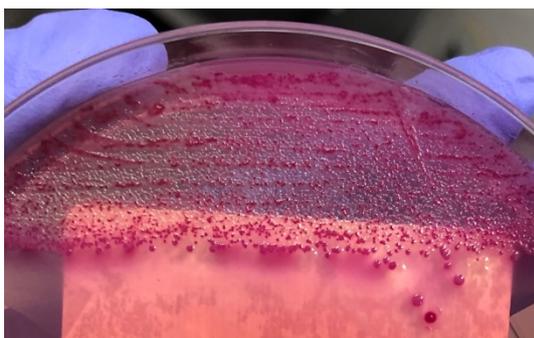


Figura 16 – Placa de gelose MCK com colónias de bactérias fermentadoras da lactose

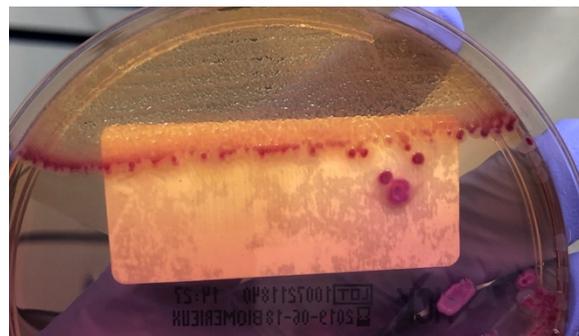


Figura 17 – Placa de gelose MCK com colónias de bactérias não fermentadoras (transparentes/amareladas) e fermentadoras (rosa) da lactose

Durante o período de estágio foram observadas algumas bactérias com β -hemólise que foram posteriormente identificadas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, sendo o primeiro um microrganismo patogénico e o segundo pertencente à microbiota da pele.

Na Figura 18 podem observar-se colónias de bactérias com α -hemólise, que foram posteriormente identificadas.

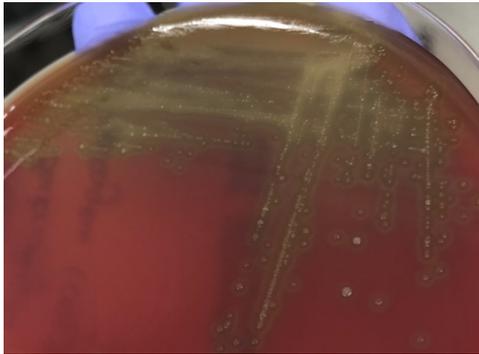


Figura 18 – Placa de gelose COS com colónias de bactéria α -hemolítica

Nas Figuras 19 e 20 podem observar-se leveduras da espécie *Candida albicans* e na Figura 21 leveduras do género *Candida* spp.



Figura 19 – Placa de gelose CAN2 com crescimento de *Candida albicans*



Figura 20 – Placa de gelose CAN2 com crescimento de *Candida albicans*



Figura 21 – Placa de gelose CAN 2 com crescimento de *Candida* spp.

Durante o período de estágio não foram observadas culturas positivas de bactérias dos géneros *Neisseria* e *Haemophilus*.

10.4.4. Coprocultura

A inoculação de fezes efetua-se nos seguintes meios: Gelose Campyloesel (CAM), Gelose Hektoen (HEKT) e Caldo Selenito F (SELENITO F-T).

A gelose Hektoen é um meio de isolamento seletivo e diferencial de *Salmonella* e *Shigella*. Os elementos que conferem seletividade ao meio são sais biliares que se encontram presentes em concentrações inibitórias para microrganismos de Gram positivo assim como para muitos microrganismos de Gram negativo integrantes da microbiota intestinal. Os elementos diferenciais são: salicina, lactose, sacarose e sais férricos (tiosulfato de sódio, citrato férrico amoniacal). A maioria dos microrganismos não patogénicos fermentam um ou dois dos açúcares presentes no meio dando origem a colónias de cor amarela/laranja ou cor-de-rosa amarelado/salmão devido à interação do pH com os corantes incorporados no meio. Enquanto os microrganismos não fermentadores, como *Salmonella* e *Shigella* spp., dão origem a colónias de cor verde a verde azulada. O meio contém também uma elevada quantidade de peptonas, que favorece o crescimento de *Salmonella* e *Shigella*, diminuindo o efeito inibitório dos sais biliares no caso da *Shigella*. (Garcia e Isenberg, 2007; King e Metzger, 1968) Os microrganismos produtores de sulfureto de hidrogénio (H₂S) dão origem a colónias de centro negro, isto porque o H₂S reage com o citrato férrico amoniacal presente no meio, originando um precipitado negro. Sendo assim, as colónias de *Shigella* são verdes e as de *Salmonella* verdes ou azuis, podendo as colónias de *Salmonella* ter o centro negro. (Garcia e Isenberg, 2007)

A gelose CAM é um meio de enriquecimento seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp. O meio contém, entre outros, sangue de carneiro, que fornece o grupo heme e outros fatores de crescimento, e uma mistura de antibióticos, que inibem a microbiota intestinal. Este meio deve ser incubado em atmosfera microaerofílica. (Murray et al., 2007)

O caldo selenito F é um meio de enriquecimento para espécies de *Salmonella*. (Atlas, 2010) O caldo selenito contém peptonas de caseína e de carne como fonte de nutrientes. Se o tempo de incubação do meio for entre 12 horas a 18 horas a microbiota intestinal é inibida. São adicionados ao caldo lactose e fosfato de forma a manter estável o pH. (Murray et al., 2007)

10.4.4.1. Interpretação das placas

Durante o período de estágio não foram observadas coproculturas positivas, ou seja, microrganismos com características patogénicas.

Na Figura 22 pode observar-se o aspeto das colónias formadas por microrganismos não patogénicos em gelose HEKT.



Figura 22 – Placa de gelose HEKT com colónias de microrganismos não patogénicos

10.4.5. Identificação de bactérias dos géneros *Neisseria* e *Haemophilus*

As bactérias do género *Haemophilus* são de Gram negativo, pleomórficas e algumas espécies fazem parte da microbiota de membranas mucosas. Duas espécies patogénicas importantes deste género são *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus ducreyi*. Para a pesquisa destas espécies são utilizadas amostras nasofaríngeas, pús, sangue e líquido cefalorraquidiano. (Brooks et al., 2007)

Haemophilus influenzae é encontrado nas membranas mucosas do trato respiratório superior e consiste numa importante causa de meningite em crianças e infeções respiratórias ocasionais (crianças e adultos). Para crescer requer tanto o fator X como o fator V e não provoca hemólise. (Brooks et al., 2007)

Haemophilus ducreyi é transmitido sexualmente e é responsável pelo cancroide (úlceras no aparelho genital). O seu crescimento requer o fator X, mas não o fator V. (Brooks et al., 2007)

As bactérias do género *Neisseria* são diplococos de Gram negativo e crescem melhor em condições de anaerobiose. Existem muitas espécies de *Neisseria* que fazem parte da microbiota do trato respiratório superior e do trato gastrointestinal, sendo as espécies patogénicas *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*. (Ahmad et al., 2014)

Neisseria meningitidis provoca meningite de progressão rápida e transmite-se através da inalação de gotículas de aerossóis respiratórias contaminadas, visto que esta bactéria pode colonizar o trato respiratório superior de pessoas saudáveis. As amostras biológicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial de infeção por *Neisseria meningitidis* são o líquido cefalorraquidiano, sangue, amostras de lesões na pele e exsudatos nasofaríngeos. (Ahmad et

al., 2014) Esta bactéria é fermentadora da glucose e maltose e não fermentadora da lactose e sacarose/frutose. (Brooks *et al.*, 2007)

A *Neisseria gonorrhoeae* é o agente etiológico da gonorreia e é transmitida por via sexual. As amostras utilizadas para a pesquisa desta espécie são pús e secreções uretrais, cervicais, rectais, da conjuntiva, garganta ou fluido sinovial, podendo também ser utilizado o sangue para detecção de infecções sistémicas. Esta bactéria é fermentadora da glucose e não fermentadora da maltose, lactose e sacarose/frutose. (Brooks *et al.*, 2007)

Ao contrário do que acontece com as outras bactérias, os géneros *Neisseria* e *Haemophilus* não são identificados pelo equipamento usado no laboratório, mas sim através do teste comercial api NH.

O api NH é constituído por 13 testes, sendo estes 4 testes de fermentação (glucose, frutose, maltose e sacarose), 8 testes de reações enzimáticas (ornitina descarboxilase – ODC, urease, lipase, fosfatase alcalina, β -galactosidase, prolina arilamidase, γ -glutamil transferase, produção de indol) e detecção da penicilinase. (Barbé *et al.*, 1994)

Em cada poço de reação é adicionada uma determinada quantidade da suspensão de bactéria (equivalente a 4 na escala de McFarland), previamente preparada através do uso de colónias puras, sendo os poços de glucose, frutose, maltose, sacarose, ODC, urease e penicilinase cobertos com óleo de parafina para criar um ambiente de anaerobiose. As reações produzem uma mudança na coloração que pode ser espontânea ou revelada através da adição de reagentes. (Barbé *et al.*, 1994)

O teste da ornitina descarboxilase (ODC) determina se um microrganismo tem a capacidade de remover o grupo carboxilo do aminoácido ornitina, através desta enzima. (Vermelho *et al.*, 2006)

O teste da urease determina se um microrganismo sintetiza a enzima urease, que hidrolisa ureia em duas moléculas de amoníaco (NH_3). Este teste utiliza um meio com ureia, fatores essenciais para o crescimento dos microrganismos e um indicador de pH. Ao utilizar a ureia do meio convertendo a mesma em amoníaco o pH aumenta, alterando a cor do indicador de pH. (Vermelho *et al.*, 2006)

A penicilinase é uma reação que ocorre através de enzimas que têm a capacidade para cortar as ligações do anel β -lactâmico das penicilinas. (Pollock, 1967)

10.4.6. Equipamento *Vitek Compact*

O sistema do equipamento *Vitek Compact* efetua a identificação de microrganismos através de testes bioquímicos. Para isto, devem ser utilizadas colónias puras na preparação de uma suspensão em solução salina, controlada por turbidimetria. (Ligozzi *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2001; Shetty, Hill e Ridgway, 1998)

Este equipamento usa cartas de identificação específicas para diferentes grupos de bactérias, sendo que para a identificação de bactérias de Gram negativo são usadas as cartas VITEK 2 GN e para a identificação de bactérias de Gram positivo as cartas VITEK 2 GP. As cartas de teste utilizadas contêm diversos poços de reação, cada um correspondente a um determinado teste bioquímico. O equipamento tem a capacidade de diferenciar microrganismos de Gram positivo/negativo através da medição da atenuação da luz, por um *scanner* ótico. Após o enchimento automático das cartas com a suspensão bacteriana, estas são seladas e incubadas (entre 3 a 15 horas), sendo que durante a incubação as cartas são lidas pela medição de fluorescência, turbidimetria e sinais colorimétricos a cada 15 minutos. Depois o *software* analisa os dados e reporta automaticamente os resultados. (Ligozzi *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2001; Shetty, Hill e Ridgway, 1998)

Existem diversos testes que podem ajudar na escolha da carta de teste a utilizar, como a coloração de Gram e testes da catalase e da coagulase. (Shetty, Hill e Ridgway, 1998)

O teste da catalase realiza-se colocando uma colónia pura numa lâmina e de seguida uma gota de peróxido de hidrogénio sobre ela, sendo que se ocorrer formação de bolhas considera-se que a bactéria é catalase positiva. Isto ocorre porque a catalase converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. Este teste diferencia *Staphylococcus*, que são catalase positivo, de *Streptococcus*, que são catalase negativo. (Brooks *et al.*, 2007)

Staphylococcus aureus é produtor de coagulase, que é uma proteína do tipo enzimático que através da ligação à protrombina promove a formação de coágulos. Os testes rápidos baseiam-se na deteção do fator de aglutinação (componente de superfície de *Staphylococcus aureus* responsável pela adesão dos microrganismos ao fibrinogénio e fibrina), proteína A (liga à região Fc da IgG humana) e outras estruturas de *Staphylococcus aureus*. Nestes testes usam-se partículas de latex revestidas com fibrinogénio e IgG humanos, que aglutinam na presença de *Staphylococcus aureus*. Outras espécies de *Staphylococcus* produtoras de fator de aglutinação e com proteína A podem também provocar aglutinação. Alguns *Staphylococcus aureus*, especialmente aqueles que são meticilina-resistentes podem ser revestidos por polissacarídeos capsulares, prevenindo assim a reação com a IgG ou o fibrinogénio. (Ahmad *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2007; Garcia e Isenberg, 2007)

Os testes de suscetibilidade aos antibióticos são efetuados em cartas que contêm diluições dos antibióticos dos quais se pretende determinar a concentração mínima inibitória, sendo que o resultado de suscetibilidade é diferenciado em “suscetível”, “intermédio” e “resistente” para cada um dos antibióticos testados. Existem várias cartas diferentes tanto para microrganismos de Gram positivo, como para microrganismos de Gram negativo. (Shetty, Hill e Ridgway, 1998)

10.5. Sedimento urinário

Esta é uma análise realizada tanto no setor de bioquímica, como no de microbiologia. No âmbito da microbiologia, o sedimento urinário é utilizado como um apoio na análise do crescimento bacteriano/micológico. Observa-se no dia em que a recolha da urina foi efetuada, após a mesma ter sido analisada no equipamento *AutionMax*, cujos resultados ajudam na interpretação da observação do sedimento.

Esta análise é efetuada após centrifugação da urina e consiste na observação microscópica (objetiva de 40x) do sedimento urinário, na qual são observados/quantificados vários parâmetros (número de elementos por campo, fazendo-se a contagem entre 5 a 10 campos), sendo estes leucócitos, eritrócitos e outros elementos (como células, cristais, cilindros, leveduras, *Trichomonas vaginalis*, entre outros). (Heilberg e Schor, 2003; Lopes e Tavares, 2005)

Quando se trata de uma análise de urina assética, no caso de se observarem leveduras no sedimento urinário, a urina deve ser inoculada também em meio CAN2, para pesquisa de *Candida spp.* ou, mais especificamente, *Candida albicans*.

10.6. Pesquisa de parasitas nas fezes

Quando se suspeita clinicamente de uma parasitose intestinal é fundamental a execução de uma pesquisa de formas parasitárias nas fezes. Para isso devem ser utilizadas amostras colhidas no dia, principalmente para observação de trofozoítos protozoários móveis, como amebas, flagelados e ciliados, que são mais comuns nos casos de diarreia. Para além destas formas, também se efetua a pesquisa de ovos de helmintas e ovos ou quistos de protozoários. (Garcia *et al.*, 2017)

A pesquisa destas formas parasitárias nas fezes deve ser efetuada após um método de concentração da amostra. Existem dois tipos de métodos de concentração, os de sedimentação e os de flutuação. No Coimbralab é utilizado o método de concentração de sedimentação formalina – acetato de etilo. Neste método a formalina 10 % é usada com o objetivo de preservar a amostra, enquanto o acetato de etilo tem a função de remover gordura

e detritos das fezes, permitindo que as formas parasitárias permaneçam na parte inferior do tubo. (Garcia et al., 2017)

Após o tratamento com formalina 10 % e acetato de etilo, as amostras são centrifugadas e o sedimento é observado microscopicamente com as objetivas de 10x e 40x, com iodo. (Garcia et al., 2017)

Durante o período de estágio não foram observadas amostras de fezes parasitadas, exceto em amostras do controlo de qualidade externo.

10.7. Pesquisa de parasitas do género *Plasmodium* no sangue

Os parasitas do género *Plasmodium* são intracelulares e infetam apenas eritrócitos e algumas outras células tecidulares dos vertebrados. A sua transmissão é feita através da picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. (Brooks et al., 2007)

Os humanos são infetados principalmente pelas espécies *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*. Estas espécies distinguem-se através de características específicas de cada uma, como as alterações que provocam nas células parasitadas, o nível de parasitémia, o tamanho dos trofozoítos em anel, as formas dos trofozoítos maduros, a segmentação dos esquizontes maduros, o tipo de gametócitos e o tipo de distribuição no sangue periférico, sendo estas características descritas na tabela I. (Brooks et al., 2007)

A amostra de sangue deve ser colhida durante o período febril e a pesquisa destes parasitas deve ser feita tanto em gota espessa, como em esfregaço de sangue, devendo ambas ser coradas por uma coloração de Grunwald-Giemsa. (Brooks et al., 2007)

Durante o período de estágio foi realizada apenas uma pesquisa de parasitas do género *Plasmodium* no sangue, cujo resultado foi dado como negativo.

Foi, no entanto, observada uma amostra positiva de parasitas *Plasmodium vivax* numa amostra do controlo de qualidade externo.

Tabela I - Algumas características das espécies de *Plasmodium* que infetam os humanos. (Adaptada de (Brooks et al., 2007))

	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium malariae</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
Eritrócitos parasitados	- Alargados - Descorados - Pontilhado acentuado (granulações de Schuffner) - Invade principalmente reticulócitos	- Sem alargamento - Sem pontilhado - Invade principalmente eritrócitos maduros	- Sem alargamento - Pontilhado grosso - Invade todo o tipo de eritrócitos	- Alargados - Descorados - Algumas granulações de Schuffner - Células ovais, fimbriadas ou crenadas
Nível de parasitemia	Superior a 30.000/ μ L de sangue	Inferior a 10.000/ μ L de sangue	Pode exceder 200.000/ μ L de sangue; normal cerca de 50.000/ μ L de sangue	Inferior a 10.000/ μ L de sangue
Trofozoítos em anel	- Anéis de diâmetro elevado - Habitualmente com um grânulo de cromatina - Anéis de espessura fina	- Anéis de diâmetro elevado - Habitualmente com um grânulo de cromatina - Anéis espessos	- Anéis de baixo diâmetro - Habitualmente com dois grânulos de cromatina - Uma célula pode ser parasitada por vários anéis - Anéis finos e que podem aderir aos eritrócitos	- Anéis de diâmetro elevado - Habitualmente um grânulo de cromatina - Anéis espessos
Trofozoítos maduros	Pleomórficos	Ocasionalmente em forma de banda	Compactos e arredondados	Compactos e arredondados
Esquizontes maduros (segmentos)	Mais de 12 merozoítos (14 a 24)	Menos de 12 merozoítos grandes (6 a 12), habitualmente em rosácea	Normalmente mais de 12 merozoítos (8 a 32), muito raro no sangue periférico	Menos de 12 merozoítos grandes (6 a 12), habitualmente em rosácea
Gametócitos	Redondos ou ovais	Redondos ou ovais	Alongado, em “forma de banana”	Redondo ou oval
Distribuição no sangue periférico	Todas as formas	Todas as formas	Apenas anéis e gametócitos	Todas as formas

II. Procedimento pós-analítico

Depois de as amostras serem analisadas nos setores a que se destinam e os resultados estarem prontos a analisar, estes estão sujeitos a dois tipos de validação, a validação analítica que é efetuada pelos técnicos superiores de laboratório e a validação biopatológica que é da responsabilidade da diretora técnica do laboratório.

Os boletins são depois entregues ao utente por levantamento no laboratório, correio, correio eletrónico ou podendo também ser encaminhados para o médico do utente / centro de saúde.

As amostras de sangue são mantidas no laboratório durante uma semana após serem analisadas e as de soro e urina (destinada à quantificação de microalbuminúria) são mantidas até se terminarem as análises do processo daquele utente.

12. Conclusão

A realização deste estágio permitiu que existisse um contacto direto com a rotina de um laboratório de análises clínicas e com os profissionais de saúde que tornam possível o seu bom funcionamento. Este foi essencial como complemento da formação recebida durante todo o mestrado, permitindo aplicar e aprofundar os conhecimentos adquiridos até esta etapa, assim como entender a dinâmica de um laboratório de análises clínicas e ter a completa noção da importância de fornecer resultados fiáveis.

Foram também essenciais todas as dúvidas e dificuldades que surgiram ao longo deste período, pois foram elas que me incentivaram a questionar e a procurar novas informações importantes na minha formação.

Trabalhar com a equipa do Coimbralab foi uma experiência bastante enriquecedora tanto a nível profissional como pessoal, revelando que um bom ambiente entre os colaboradores do laboratório também é um ponto muito importante para o bom funcionamento do mesmo.

13. Bibliografia

AHMAD, Nafees *et al.* - **Sherris Medical Microbiology**. 6^a Ed. [S.l.], Mc Graw Hill Education, 2014. ISBN 978-0-07-181821-6; 0-07-181821-9.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY - Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**. ISSN 0732-183X. 14:10 (1996) 2843–2877. doi: 10.1200/JCO.1996.14.10.2843.

ANDRADE, Helena Rebelo De - Doença humana por vírus da gripe de origem aviária A (H5N1). [S.l.], **Ministério da Saúde - Direção-Geral da Saúde** (2006)

ANKERST, Donna Pauler *et al.* - Serial Percent Free Prostate Specific Antigen in Combination with Prostate Specific Antigen for Population Based Early Detection of Prostate Cancer. **Journal of Urology**. ISSN 0022-5347. 196:2 (2016) 355–360. doi: 10.1016/j.juro.2016.03.011.

ATLAS, Ronald M. - **Handbook of Microbiological Media**. 4^a Ed. [S.l.], ASM Press, 2010. ISBN 978-1-4398-0406-3.

BALLEHANINNA, Umashankar K.; CHAMBERLAIN, Ronald S. - The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. **Journal of Gastrointestinal Oncology**. ISSN 2219-679X. 3:2 (2012) 105–119. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021.

BARBÉ, G. *et al.* - Evaluation of API NH, a new 2-hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* in a routine clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 0095-1137. 32:1 (1994) 187–189.

BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - **Microbiologia Médica**. [S.l.], LIDEL, 2014. ISBN 978-989-752-057-0.

BENSON, Harold J. - **Microbiological Applications - Laboratory Manual in General Microbiology**. 8^a Ed. [S.l.], The McGraw-Hill, 2001. ISBN 0-07-231888-0.

BHALLA, Preena - Retrospective Audit of the Widal Test for Diagnosis of Typhoid Fever in Pediatric Patients in an Endemic Region. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. ISSN 2249782X. (2014). doi: 10.7860/JCDR/2014/7819.4373.

BIALECKI, Eldad S.; BISCEGLIE, Adrian M. DI - Diagnosis of hepatocellular carcinoma. **HPB**. ISSN 1365182X. 7:1 (2005) 26–34. doi: 10.1080/13651820410024049.

BROOKS, Geo. F. *et al.* - **Medical Microbiology**. 24^a Ed. [S.l.], Mc Graw Hill Medical, 2007. ISBN 0-07-151054-0.

BURTIS, Carl A. *et al.* - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. 6^a Ed. [S.l.], Saunders Elsevier, 2008. ISBN 978-0-7216-3865-2.

CARDOSO, Marta *et al.* - Mononucleose infecciosa: estudo retrospectivo. **Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-facial**. 48 (2010) 195–200.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. **MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports**. ISSN 1057-5987. 45:RR-7 (1996) 1–24.

CHOURIN, S. *et al.* - Value of CA 15-3 determination in the initial management of breast cancer patients. **Annals of Oncology**. ISSN 0923-7534. 20:5 (2009) 962–964. doi: 10.1093/annonc/mdp061.

CLARRIDGE, Jill E.; JONHSON, James R.; PEZZLO, Marie T. - **Cumitech 2B - Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections**. [S.l.], ASM Press, 1998. ISBN 9789990910803.

COOK, L. *et al.* - Evaluation of latex-based heterophile antibody assay for diagnosis of acute infectious mononucleosis. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 0095-1137. 25:12 (1987) 2391–2394.

COX, P. S. V. - A comparison of the rapid slide and standard tube agglutination tests for brucellosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. ISSN 00359203. 62:4 (1968) 517–521. doi: 10.1016/0035-9203(68)90136-3.

CUI, Chanjuan *et al.* - Evaluation of the clinical effectiveness of HIV antigen/antibody screening using a chemiluminescence microparticle immunoassay. **Journal of Virological Methods**. ISSN 01660934. 214 (2015) 33–36. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.07.026.

DIAS, José Santos - **O PSA Livre. Relação Entre o PSA Livre e o PSA Total**. 2018. [Acedido em maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://institutodaprostata.com/doencas-tratamentos/o-psa/o-psa-livre-relacao-entre-o-psa-livre-e-o-psa-total/>

DUFFY, Michael J.; EVOY, Denis; MCDERMOTT, Enda W. - CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. **Clinica Chimica Acta**. ISSN 00098981. 411:23–24 (2010) 1869–1874. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.039.

ERASO, E. *et al.* - Evaluation of the New Chromogenic Medium Candida ID 2 for Isolation and Identification of *Candida albicans* and Other Medically Important *Candida* Species. **Journal of**

Clinical Microbiology. ISSN 0095-1137. 44:9 (2006) 3340–3345. doi: 10.1128/JCM.00213-06.

FERRARI, Nancy - **What is the difference between PSA and free PSA**. 2009. [Acedido em maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.health.harvard.edu/blog/what-is-the-difference-between-psa-and-free-psa-20091001114>

FONTAINE, Michael C.; LEE, Jeong Jin; KEHOE, Michael A. - Combined contributions of streptolysin O and streptolysin S to virulence of serotype M5 *Streptococcus pyogenes* strain Manfredo. **Infection and Immunity**. ISSN 0019-9567. 71:7 (2003) 3857–3865. doi: 10.1128/iai.71.7.3857-3865.2003.

GAGNE, Sylvia Siegfried - Toxoplasmosis. **Elsevier**. 8 (2001) 122–126.

GARCIA, Lynne S. *et al.* - Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. **Clinical Microbiology Reviews**. ISSN 0893-8512. 31:1 (2017). doi: 10.1128/CMR.00025-17.

GARCIA, Lynne S.; ISENBERG, Henry D. - **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 2ª Ed. [S.l.], ASM Press, 2007

Prescrição e Determinação do Antígeno Específico da Próstata - PSA. 2011 [Acedido em maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.apaclinicos.pt/index.php/documentacao/normas-do-sns>

GOLASZEWSKA, Ewa *et al.* - Paul-Bunnell antigen and a possible mechanism of formation of heterophile antibodies in patients with infectious mononucleosis. **Acta Biochimica Polonica**. 4 (2003) 1205–1211. doi: 0350041205

GOODER, H. - Antistreptolysin-O: its interaction with streptolysin-O, its titration and a comparison of some standard preparations. **Bulletin of the World Health Organization**. ISSN 0042-9686. 25 (1961) 173–183.

GREENWOOD, David *et al.* (EDS.) - **Medical Microbiology - A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control**. 18ª Ed. [S.l.], Churchill Livingstone Elsevier, 2012. ISBN 9780702040894.

GRONOWSKI, Ann M. (ED.) - **Handbook of Clinical Laboratory Testing During Pregnancy**. [S.l.], Humana Press, 2004. ISBN 1-58829-270-3.

GUEMRA, Samuel *et al.* - Detecção de Anticorpos Heterófilos em Soros de Indivíduos Idosos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. 10 (2008) 69–74.

HAO, Cui; ZHANG, Guoqing; ZHANG, Lijuan - Serum CEA levels in 49 different types of cancer and noncancer diseases. **Elsevier**. 162 (2019) 213–227. doi: 10.1016/bs.pmbts.2018.12.011

HARRIS, Daniel C. - **Quantitative Chemical Analysis**. 8^a Ed. [S.l.], W. H. Freeman and Company, 2010. ISBN 978-1-4292-1815-3.

HEIDARI, Behzad - Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. **Caspian Journal of Internal Medicine**. ISSN 2008-6164. 2:1 (2011) 161–170.

HEILBERG, Ita Pfeferman; SCHOR, Nestor - Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 49:1 (2003) 109–116. doi: 10.1590/S0104-42302003000100043

HESS, Ralf D. - Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. **Journal of Clinical Microbiology**. 42 (2004) 3381–3387. doi: 10.1128/JCM.42.8.3381-3387.2004.

HOFBRAND, Victor A.; MOSS, Paul A. H. - **Hofbrand's Essential Haematology**. 7^a Ed. [S.l.], Wiley Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.

HOFFMAN, STEPHEN L. *et al.* - The Widal Slide Agglutination Test, a Valuable Rapid Diagnostic Test in Typhoid Fever Patients at the Infectious Diseases Hospital of Jakarta. **American Journal of Epidemiology**. ISSN 1476-6256. 123:5 (1986) 869–875. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114316.

INGEGNOLI, Francesca; CASTELLI, Roberto; GUALTIEROTTI, Roberta - Rheumatoid factors: clinical applications. **Disease markers**. ISSN 1875-8630. 35:6 (2013) 727–734. doi: 10.1155/2013/726598.

ITO, Kazuto *et al.* - Free/total PSA ratio is a powerful predictor of future prostate cancer morbidity in men with initial PSA levels of 4.1 to 10.0 ng/mL. **Urology**. ISSN 00904295. 61:4 (2003) 760–764. doi: 10.1016/S0090-4295(02)02427-5.

JÄGER, W. *et al.* - Breast cancer and clinical utility of CA 15-3 and CEA. **Scandinavian Journal of Clinical and laboratory investigation. Supplementum**. ISSN 0085-591X. 221 (1995) 87–92.

KENNEL, Kurt A.; DRAKE, Matthew T.; HURLEY, Daniel L. - Vitamin D Deficiency in Adults: When to Test and How to Treat. **Mayo Clinic Proceedings**. ISSN 00256196. 85:8 (2010) 752–758. doi: 10.4065/mcp.2010.0138.

- KING, Sylvia; METZGER, William I. - A New Plating Medium for the Isolation of Enteric Pathogens I. Hektoen Enteric Agar. **Applied Microbiology**. 16 (1968) 577–578.
- KONEMAN, Elmer W. *et al.* - **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5^a Ed. [S.l.], Lippincott Williams & Wilkins, 1997. ISBN 0-397-51529-4.
- KOŚCIELNIAK-MERAK, Barbara *et al.* - Faecal Occult Blood Point-of-Care Tests. **Journal of Gastrointestinal Cancer**. ISSN 1941-6628. 49:4 (2018) 402–405. doi: 10.1007/s12029-018-0169-1.
- LARSEN, Sandra A.; STEINER, Bret M.; RUDOLPH, Andrew H. - Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**. 8 (1995) 1–21.
- LEE, David S. C.; GRIFFITHS, Bertram W. - Human serum vitamin B12 assay methods — A review. **Clinical Biochemistry**. ISSN 00099120. 18:5 (1985) 261–266. doi: 10.1016/S0009-9120(85)80028-X.
- LIGOZZI, M. *et al.* - Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 0095-1137. 40:5 (2002) 1681–1686. doi: 10.1128/JCM.40.5.1681-1686.2002.
- LING, T. K. W. *et al.* - Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 0095-1137. 39:8 (2001) 2964–2966. doi: 10.1128/JCM.39.8.2964-2966.2001.
- LONGO, Paulo Eduardo *et al.* - Avaliação Comparativa de Teste Imunocromatográfico para Identificação Forense de Sangue Humano. **Revista Brasileira de Criminalística**. ISSN 2237-9223. 1:1 (2011) 16. doi: 10.15260/rbc.v1i1.11.
- LOPES, Hélio Vasconcellos; TAVARES, Walter - Diagnóstico das infecções do trato urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**. ISSN 0104-4230. 51:6 (2005) 306–308. doi: 10.1590/S0104-42302005000600008.
- MAGRO, Ana Maria; BENTO, Rui San - Marcadores tumorais. **Medicina Interna**. 4 (1997) 189–196.
- MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C.; MANUSELIS, George - Textbook of Diagnostic Microbiology. 5^a Ed. [S.l.], **Saunders Elsevier**, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0.
- MARTINS, Carlos - Toxoplasmose na gravidez. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**. (2002) 333–340.

MARTINS PERIN, Luana *et al.* - Glucuronidase activity of *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**. ISSN 1517-8382. 41:3 (2010) 819–823. doi: 10.1590/S1517-838220100003 00036.

MAZOYER, M. A. *et al.* - Evaluation of CPS ID2 medium for detection of urinary tract bacterial isolates in specimens from a rehabilitation center. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 0095-1137. 33:4 (1995) 1025–1027.

MERT, Ali *et al.* - The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. ISSN 07328893. 46:4 (2003) 241–243. doi: 10.1016/S0732-8893(03)00081-6.

MILMAN, Nils - Intestinal absorption of folic acid - new physiologic & molecular aspects. **The Indian Journal of Medical Research**. ISSN 0971-5916. 136:5 (2012) 725–728.

MONGET, Daniel *et al.* - **Milieu de détection et/ou d'identification de bactéries**. patente WO 2008/104681 A22008. 2008 [Acedido em junho de 2019]. Disponível na Internet: <https://patents.google.com/patent/WO2008104680A2/fr>

MONTGOMERY, Jeffrey *et al.* - Role of biochemical markers in testicular cancer: diagnosis, staging, and surveillance. **Open Access Journal of Urology**. ISSN 1179-1551. (2011) 1. doi: 10.2147/OAJU.S15063.

MOSS, E. L. - The role of CA125 in clinical practice. **Journal of Clinical Pathology**. ISSN 0021-9746. 58:3 (2005) 308–312. doi: 10.1136/jcp.2004.018077.

MROCZYŃSKA, Marta; LIBUDZISZ, Zdzisława - Beta-glucuronidase and beta-glucosidase activity of *Lactobacillus* and *Enterococcus* isolated from human feces. **Polish Journal of Microbiology**. ISSN 1733-1331. 59:4 (2010) 265–269.

MULE, Prashant *et al.* - Heterophile Antibody Positive Infectious Mononucleosis by Epstein Barr Virus (EBV) - A Short Review. **Acta Scientific Microbiology**. ISSN: 2581 - 3226. 1 (2018) 44–49.

MURRAY, Patrick. R. *et al.* - **Manual of Clinical Microbiology**. 9^a Ed. [S.l.], ASM Press, 2007. ISBN 978-1-55581-371-0.

NAIR, Rathish; MASEEH, Arun - Vitamin D: The «sunshine» vitamin. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**. ISSN 0976-5018. 3:2 (2012) 118–126. doi: 10.4103/0976-500X.95506.

- ORENGA, Sylvain *et al.* - Enzymatic substrates in microbiology. **Journal of Microbiological Methods**. ISSN 01677012. 79:2 (2009) 139–155. doi: 10.1016/j.mimet.2009.08.001.
- PERKINS, Greg L. *et al.* - Serum tumor markers. **American Family Physician**. ISSN 0002-838X. 68:6 (2003) 1075–1082.
- POLLOCK, M. R. - Origin and function of penicillinase: a problem in biochemical evolution. **British Medical Journal**. ISSN 0007-1447. 4:5571 (1967) 71–77. doi: 10.1136/bmj.4.5571.71.
- PORTUGAL. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE - **Saúde Reprodutiva Doenças Infecciosas e Gravidez**. Lisboa, 2000. ISBN 972-9425-84-1.
- PRAÇA, Fabíola S. G. *et al.* - Current aspects of breast cancer therapy and diagnosis based on a nanocarrier approach. Em *Nanostructures for Cancer Therapy*. [S.l.], Elsevier, 2017, ISBN 978-0-323-46144-3. p. 749–774. doi: 10.1016/B978-0-323-46144-3.00027-1
- PRESTES-CARNEIRO, Luiz Euribel; ACÊNCIO, Eloáh Dos Santos Lopes; POMPEI, Andréa Cristine De Souza Do Carmo - Determinação de anti-estreptolisina «O» e proteína C reativa entre escolares do município de Laranjal, PR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. ISSN 0037-8682. 38:1 (2005) 67–68. doi: 10.1590/S0037-86822005000100015.
- RAAFAT, Reham; DWEDAR, Reham; EL-SEIDI, Eman - Evaluation of the Chromogenic Medium (CPS) in the Isolations and Identification of Urinary Tract Pathogens. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**. 24 (2015) 29–34.
- SALAZAR, Juan *et al.* - C-Reactive Protein: Clinical and Epidemiological Perspectives. **Cardiology Research and Practice**. ISSN 2090-8016. (2014) 1–10. doi: 10.1155/2014/605810.
- SANTOS, Leonor Maria Pacheco; PEREIRA, Michelle Zanon - Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cadernos de Saúde Pública**. ISSN 0102-311X. 23:1 (2007) 17–24. doi: 10.1590/S0102-311X2007000100003.
- SCHROEDER, Steven A. - Interpretation of Serologic Tests for Typhoid Fever. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**. ISSN 0098-7484. 206:4 (1968) 839. doi: 10.1001/jama.1968.03150040051012.
- SEN, E. S.; RAMANAN, A. V - How to use antistreptolysin O titre. **Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition**. ISSN 1743-0585. 99:6 (2014) 231–237. doi: 10.1136/archdischild-2013-304884.

SENEWIRATNE, B.; SENEWIRATNE, K. - Reassessment of the Widal test in the diagnosis of typhoid. **Gastroenterology**. ISSN 0016-5085. 73:2 (1977) 233–236.

SHETTY, N.; HILL, G.; RIDGWAY, G. L. - The Vitek analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing: protocols, problems, and pitfalls. **Journal of Clinical Pathology**. ISSN 0021-9746. 51:4 (1998) 316–323. doi: 10.1136/jcp.51.4.316.

SIZAR, Omeed; GIVLER, Amy - **Vitamin D Deficiency**. 2019. [Acedido em junho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30335299>

STIEBER, Petra *et al.* - Diagnostic efficacy of CA 15-3 and CEA in the early detection of metastatic breast cancer - A retrospective analysis of kinetics on 743 breast cancer patients. **Clinica Chimica Acta**. ISSN 00098981. 448 (2015) 228–231. doi: 10.1016/j.cca.2015.06.022.

STRUTHERS, J. Keith *et al.* - **Medical Microbiology Testing in Primary Care**. [S.l.], Manson Publishing, 2012. ISBN 978-1-84076-159-7.

TIWARI, Vivekanand; BERGMAN, Marty J. - **Rheumatoid Factor**. 2019. [Acedido em julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532898/>

VANDEPITTE, J. *et al.* - **Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology**. 2ª Ed. [S.l.], World Health Organization, 2003. ISBN 92-4-154545-3.

VERMELHO, Alane Beatriz *et al.* - **Práticas de Microbiologia**. [S.l.], Nova Guanabara, 2006. ISBN 9788527711654.

WESTGARD, James O. - **Westgard Rules and Multirules**. 2002. [Acedido em julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.westgard.com/mltirule.htm#westgard>

WILD, David (ED.) - **The Immunoassay Handbook - Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques**. 4ª Ed. [S.l.], Elsevier Science, 2013. ISBN 978-0-08-097037-0.

WILLINGER, B. *et al.* - Performance of Candida ID, a New Chromogenic Medium for Presumptive Identification of Candida Species, in Comparison to CHROMagar Candida. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 0095-1137. 39:10 (2001) 3793–3795. doi: 10.1128/JCM.39.10.3793-3795.2001.

YAMAMOTO, Makiko *et al.* - Interaction of the DF3/MUC1 Breast Carcinoma-associated Antigen and β -Catenin in Cell Adhesion. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 272:19 (1997) 12492–12494. doi: 10.1074/jbc.272.19.12492.