

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Beatriz Reis Antunes

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas orientado pela Dra. Maria Beatriz Godinho e pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2019



Beatriz Reis Antunes

Relatório de Estágio  
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas, orientado pela  
Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Godinho Tomaz dos Santos e pela Professora Doutora Gabriela  
Conceição Duarte Jorge Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de  
Coimbra.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## Agradecimentos

À Administração do Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A., o meu muito obrigada pela oportunidade de realizar o Estágio do Mestrado de Análises Clínicas na vossa empresa e por todas as ferramentas e conhecimento que me deram ao longo destes seis meses. Um especial agradecimento à Dra. Maria Beatriz Tomaz por ter orientado o meu estágio e por estar sempre disponível para qualquer situação.

A todos os colegas do laboratório, a quem devo muito pela paciência, ajuda e entrega que sempre mostraram, em especial à Dra. Délia Silva e Dra. Ana Jacinta por terem contribuído com o seu conhecimento e experiência para a escrita deste relatório. À equipa “maravilha” do Posto de Colheitas de Gândara dos Olivais, que foram um apoio incondicional, colegas sempre dedicados e mais do que isso, foram amizades que ficaram.

À Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Silva pela ajuda, disponibilidade e apoio que me prestou ao longo destes meses de Estágio.

Finalmente, a elaboração do presente relatório não seria possível sem o apoio incondicional dos meus pais, João e Teresa, do Micael que me motivou e acompanhou durante todo este percurso e a todos os que, de alguma forma, se cruzaram no meu caminho e contribuíram para a realização deste Estágio.



## Índice

Agradecimentos .....	4
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas.....	12
Lista de Abreviaturas .....	14
Resumo .....	18
Abstract .....	19
Introdução .....	20
1. Caracterização do laboratório Labeto .....	22
1.1. Fluxo de amostras .....	22
1.1.1. Fase pré-analítica .....	22
1.1.2. Fase analítica .....	24
1.1.3. Fase pós-analítica .....	24
2. Microbiologia:.....	26
2.1. Colorações usadas em Microbiologia:.....	27
2.2. Meios de cultura:.....	27
Gelose Hecktoen.....	27
Caldo Tetrionato: .....	27
Gelose MacConkey:.....	28
Gelose Manitol Salt Agar (MSA): .....	28
Gelose Chocolate:.....	28
Gelose Sangue: .....	28
Gelose Candida:.....	28
Gelose Sabouraud: .....	29
Gelose de Mueller-Hinton.....	29
Caldo Todd-Hewitt.....	29

Meio chromID® CPS® Elite (CPSE):.....	29
Meio chromID® Strepto B (STRB): .....	29
Meio Löwenstein-Jensen: .....	29
2.3. Amostras analisadas: .....	30
• Coprocultura:.....	33
• Exame parasitológico:.....	34
• Pesquisa de <i>Streptococcus</i> do grupo B:.....	35
• Exsudado vaginal:.....	36
• Exsudado uretral: .....	38
• Exsudado faríngeo:.....	39
• Exsudado Auricular:.....	40
• Exsudado Nasal:.....	41
• Exsudado purulento:.....	42
2.4. Identificação bacteriana e Antibiograma: .....	44
2.5. Controlo de Qualidade:.....	45
2.6. Caso Clínico:.....	46
3. Hematologia:.....	48
4. Imunologia:.....	48
4.1. Serologia.....	48
4.1.1. VDRL ( <i>Venereal Disease Research Laboratory</i> ou teste não treponémico).....	48
4.1.2. Reação de Widal.....	49
4.1.3. Reação de Rosa Bengala.....	50
4.1.4. Teste de Paul-Bunnel .....	50
4.1.5. Reação de Weil-Felix.....	50
4.1.6. Reação de Waaler-Rose .....	51
4.2 Auto-imunidade:.....	51
4.2.1. Doenças Autoimunes: .....	52



4.2.2. Imunoensaios usados em Autoimunidade:.....	52
4.2.3. Testes laboratoriais associados a Doenças Autoimunes:.....	55
4.2.3.1. Lúpus Eritematoso Sistémico: .....	57
4.2.3.2. Vasculites:.....	58
4.2.3.3. Colangite Biliar Primária (CBP):.....	59
4.2.3.4. Hepatite Autoimune:.....	60
4.2.3.5. Anemia Perniciosa:.....	62
4.2.3.6. Doença celíaca: .....	63
4.2.4. Caso Clínico: .....	64
4.2.5. Controlo de Qualidade (CQ):.....	65
Conclusões:.....	66
Bibliografia .....	68
Anexo.....	72



## Índice de Figuras

Figura 1: Uroculturas em meio CPSE.....	31
Figura 2: Quantificação de UFC em uroculturas .....	32
Figura 3: Esquema do procedimento para Identificação Bacteriana (Adaptado de [11]). .....	37
Figura 4: a) <i>S. aureus</i> em gelose MSA; b) Teste da coagulase positivo para <i>S. aureus</i> .....	38
Figura 5: Esquema de leitura de placas no exsudado orofaríngeo para identificação bacteriana. .....	40
Figura 6: Colônias de BK em meio Löwestein-Jensen.....	43
Figura 7: Leitura dos meios às 24h de incubação: a) 2 colônias distintas em COS; b) 1 tipo de colônias em Gelose MacConkey; c) 1 tipo de colônia em MSA. ....	46
Figura 8: a) Leitura do meio CPSE após 24h; b) Teste de aglutinação STAPH. Plus positivo; c) Teste da oxidase positivo. ....	47
Figura 9: Reação de Widal positiva para o antígeno O.....	49
Figura 10: Resultado em título do Teste de Widal. ....	49
Figura 11: Esquema da técnica de ELISA indireta (Adaptado de Kuby Immunology 8ªed). ....	53
Figura 12: Técnica de IFI. a) Lâmina de fluorescência com substrato; b) Aparelho de imunofluorescência EUROIMMUN IF Sprinter.....	54
Figura 13: Leitura dos Immunoblots por EuroLineScan: a) Tiras de Immunoblot; b) Resultados obtidos pelo EuroLineScan.....	55
Figura 14: Padrões de fluorescência reportados pelo ICAP. ....	56
Figura 15: Padrões de fluorescência de ANCA em granulócitos fixados em etanol: a) ANCA negativo; b) cANCA; c) pANCA.....	59
Figura 16: Padrões de fluorescência de AMA em diferentes substratos: a) Citoplasmático uniforme em corte de estômago; b) Granular em corte de fígado; c) Granular em corte de rim.....	60
Figura 17: Padrões de fluorescência em ASMA (a,b,c) e LKMI (d,e) em diferentes substratos: a) Fluorescência nos vasos e glomérulos em rim de rato; b) Fluorescência nos filamentos de F-actina em células VSM47; c) Fluorescência nos vasos em fígado de rato; d) Fígado de rato; e) Rim de rato. ....	61



## Índice de Tabelas

Tabela 1: Tipos de tubos usados nas colheitas de sangue .....	23
Tabela 2: Aparelhos usados no laboratório Labeto.....	24
Tabela 3: Resultados das análises feitas a homem de 51 anos e respectivos valores de referência.....	64



## Lista de Abreviaturas

- AAcS: Auto-anticorpos
- Acs: Anticorpos
- Ag: antigénio
- ALP: Fosfatase Alcalina
- AMA: Anticorpos Anti-Mitocôndrias
- ANA: Anticorpos Anti-Nucleares
- ANCA: Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos
- APCA: Anticorpos Anti-Células Parietais
- APCER: Associação Portuguesa de Certificação
- AR: Artrite Reumatóide
- ASMA: Anticorpos Anti-Músculo Liso
- ATCC: *American Type Culture Collection*
- BAAR: Bacilos ácido-álcool resistentes
- BK: Bacilo de Koch
- C. : *Candida spp.*
- CBP: Cirrose Biliar Primária
- CENP-B: *Centromere Protein B*
- c-HDL: Colesterol associado às HDL
- c-LDL: Colesterol associado às LDL
- CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMV: Citomegalovírus
- CPK: Creatinofosfocinase
- DAI: Doenças Autoimunos
- DGS: Direção Geral de Saúde
- DMTC: Doença Mista do Tecido Conjuntivo
- EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA: *Enzyme-Linked Immunoassay*
- EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- Fc: Fragmento cristalizável
- FR: Fator Reumatóide

- FTA-ABS: *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*
- HDL: Lipoproteína de alta densidade (*High-Density Lipoprotein*)
- H<sup>2</sup>S: Ácido Sulfídrico
- HLA: *Human Leucocyte Antigen*
- HRP: *Horse-radish peroxidase*
- ICAP: *International Consensus on ANA Patterns*
- IFI: Imunofluorescência Indireta
- INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
- ISO: Organização Internacional de Normalização
- Jo-1: *Histidyl-tRNA synthetase*
- LDL: Lipoproteína de baixa densidade (*Low-Density Lipoprotein*)
- LES: Lúpus Eritematoso Sistémico
- LKM: *Liver/kidney microsomal antibodies*
- MPO: Mieloperoxidase
- MRSA: *Staphylococcus aureus* metilina resistentes
- NAD: Dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NH: Carta VITEK Neisseria-Haemophilus
- PBS: Tampão fosfato-salino (*Phosphate buffered saline*)
- PCNA: *Proliferating Cells Nuclear Antigen*
- PCR: Proteína C reativa
- PM-Scl: Complexo proteico encontrado no exossoma
- PR3: Proteinase 3
- RNP: Ribonucleoproteínas
- Ro-52: Ribonucleoproteína de 52kDa
- Rpm: Rotações por minuto
- S.: *Staphylococcus sp.*
- SI: Sistema Imunitário
- Sm: Antígeno *Smith*
- SSA: *Sjögren's Syndrome A*
- SSB: *Sjögren's Syndrome B*
- TGO (AST): Aspartato Amino-Transferase
- TGP (ALT): Alanina Amino-Transferase
- TPHA: *Treponema pallidum Hemagglutination Assay*



- UFC: Unidades Formadoras de Colónias
- UTI: Infecções do Trato Urinário
- VDRL: *Venereal Disease Research Laboratory*



## Resumo

As Análises Clínicas são uma área em constante evolução e crescimento, uma vez que são fundamentais no diagnóstico e monitorização de diversas patologias, permitindo uma deteção precoce das mesmas.

Com a elaboração deste relatório pretende-se descrever as atividades desenvolvidas ao longo do Estágio Curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sendo esta descrição fundamentada pelos conceitos teóricos que lhe servem de base. Este Estágio foi realizado no Laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A., durante o período de seis meses, no qual tive a oportunidade de aprofundar a componente teórica adquirida ao longo do Mestrado de Análises Clínicas, e especialmente de aplicar estes conhecimentos na prática laboratorial, adquirindo ao longo do tempo autonomia nas diversas fases da rotina diária de um laboratório.

Em termos estruturais será descrito o funcionamento e organização do Laboratório, todas as fases envolvidas na rotina laboratorial, desde a chegada do utente, à colheita das amostras biológicas, até à entrega do boletim de resultados, as metodologias e aparelhos utilizados, especificamente das áreas da Microbiologia e Autoimunidade/ Serologia, assim como o controlo de qualidade realizado nas mesmas.

No final deste relatório irei fazer uma reflexão sobre o Estágio e o mestrado em geral, os seus pontos positivos e algumas sugestões que considero importantes, de modo a que se obtenha o máximo aproveitamento do Estágio e uma melhor preparação para a integração na vida profissional.

**Palavras-chave:** Colheita de amostras, Microbiologia, Serologia, Autoimunidade, Controlo de Qualidade

## Abstract

Clinical Analysis represent an area of constant growth and evolution, due to the fact that they are essential to the diagnosis and monitoring of several pathologies, many times allowing an early detection.

The writing of the present report aims to describe the activities performed during the Master's degree in Clinical Analysis internship, which is fundamented by theoretical concepts that serve as the basis. This internship took place in Laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, SA, for a six month period, in which I had the opportunity to deepen the theoretical component acquired during the Master degree, to learn new informations and methologies but especially to apply this knowledge in the laboratory practice and to gain autonomy in the different phases of a daily laboratory routine.

The structure of this report will describe the organization and functioning of the Laboratory, all the different phases involved in each analysis, from the arrival of the patient, to the sample collection and delivery of the final results, the methodologies and automatic/ semi-automatic instruments used, specifically in Microbiology and Autoimmunity/ Infectious Serology, as well as the quality control performed in these areas.

In the end I will reflect upon the internship and the Master degree in general, its ups and downs and some aspects that I believe will improve the Internship experience in order to obtain the best results possible as well as to prepare the student to enroll into the worklife.

**Keywords:** Sample collection, Microbiology, Autoimmunity, Serology, Quality Control

## Introdução

O estágio do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é um estágio profissionalizante que permite ao aluno adquirir diversas competências teóricas que complementam a formação adquirida ao longo do curso, assim como a prática laboratorial necessária para iniciar a vida profissional num laboratório.

As Análises Clínicas são uma área extremamente vasta e em contínua evolução, permitindo o estudo de diversas patologias, deteções mais precoces das mesmas e resultados cada vez mais rápidos. A crescente expansão desta área tem levado à automatização dos laboratórios, permitindo a análise de mais amostras num menor espaço de tempo, a repetibilidade das mesmas, a sua rastreabilidade e um controlo de qualidade mais apertado.

Este estágio foi realizado no Laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A., onde tive a oportunidade de passar por todas as valências que compõem a vasta área das Análises Clínicas: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica, Endocrinologia, Imunologia e Biologia Molecular.

Neste relatório vou aprofundar detalhadamente as áreas de Microbiologia e Autoimunidade/ Serologia, assim como o controlo de qualidade realizado nestes setores.



## I. Caracterização do laboratório Labeto

Fundado em 1974, o Laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A., situa-se na Avenida Marquês de Pombal, lote 2, 1º Apartado, Leiria, sob a direção técnica da Dra. Beatriz Olinda de Oliveira Santos Godinho Tomaz, especialista em Análises Clínicas e fundadora do Laboratório, juntamente com o Dr. Amado Elias Tomaz.

Pertencendo ao Grupo Beatriz Godinho Saúde, ao qual pertencem também os Laboratórios de Análises Clínicas Laboratório José Manuel Chau (Coimbra) e o Laboratório Seialab (Seia), a empresa Polidiagnóstico, Polidiagnóstico Empresas, o Laboratório Tomaz, a Clínica Luís Lourenço e uma vasta rede de farmácias. O grupo possui mais de 130 postos de colheitas, sendo que cerca de 59 se localizam no distrito de Leiria e as amostras que nestes são colhidas, são transportadas e analisadas no Laboratório Labeto, assim como amostras provenientes de lares, clínicas e de colheitas feitas ao domicílio. Diariamente, o laboratório tem em média 1200 utentes, o que evidencia o elevado prestígio e notabilidade que este laboratório tem na área das Análises Clínicas na região Centro.

O Labeto possui também dupla certificação, segundo a Norma ISO 9001, do Sistema de Gestão da Qualidade pela APCER, desde 2003 e a fiabilidade dos resultados é comprovada pelo uso constante de controlos internos e externos e pelo bom desempenho obtido nos Programas de Avaliação Externa de Qualidade.

O laboratório funciona de segunda a sábado, estando dividido na secções de: Bioquímica/Endocrinologia/Imunologia (core lab), Serologia Infeciosa, Urianálise, Autoimunidade, Hemostase, Microbiologia, Hematologia e Biologia Molecular e Genética.

### I.1. Fluxo de amostras

#### I.1.1. Fase pré-analítica

Durante toda a duração do meu estágio (seis meses) estive maioritariamente no posto de colheitas de Gândara dos Olivais, das 8h às 11h, onde participei na fase pré-analítica, fazendo a receção dos utentes, registando os seus processos no sistema informático e procedendo à colheita das amostras biológicas correspondentes. Esta fase inicia-se com a chegada do utente ao posto de colheitas, onde retira uma senha e aguarda pela sua vez na sala de espera. Quando a sua senha é chamada, este é atendido pelo/a rececionista, que faz a inscrição do utente no sistema informático, confirmando os dados do

mesmo e fazendo questões relacionadas com as análises pedidas (jejum, medicação, gravidez, etc.), colocando esta informação no processo do utente, de modo a estar acessível ao laboratório onde as análises serão realizadas. É atribuído um código interno ao utente com o código de barras correspondente, que é impresso em etiquetas, com o sufixo relativo ao setor e ao tipo de análise a ser efetuada (U0- urina, L0- hemograma, B0- bioquímica, etc.), modo a assegurar a rastreabilidade das amostras.

O utente é chamado por um técnico ou enfermeiro que o conduz à sala de colheitas, confirmando novamente os dados do utente e as análises a realizar, de modo a preparar o material necessário à colheita e à correta identificação dos tubos/contentores específicos para cada análise, como indicado na Tabela I [1]. Procede-se então à colheita das amostras, sendo que algumas análises ao serem registadas no sistema informático emitem um alerta, que informa o técnico que estas necessitam de um tratamento específico, ainda no posto de colheitas, como por exemplo, retração do coágulo, centrifugação e separação do soro, ou proteção da luz.

*Tabela I: Tipos de tubos usados nas colheitas de sangue*

<b>Tubo</b>	<b>Composição</b>	<b>Amostra usada</b>	<b>Tipo de Análise</b>
<b>Tampa vermelha</b>	Sem anticoagulante	Soro	Bioquímica Imunologia
<b>Tampa lilás</b>	EDTA tripotássico	Sangue total	Hematologia
<b>Tampa azul</b>	Citrato sódico (1:9)	Plasma	Estudos de Coagulação
<b>Tampa Verde</b>	Heparina de lítio	Plasma	Bioquímica
<b>Tampa azul escura</b>	Isento de metais	Soro	Elementos vestigiais

Após a colheita das amostras, as mesmas são transportadas em malas térmicas até ao laboratório. As malas térmicas têm um termómetro incorporado que regista a temperatura, que é depois registada num documento de qualidade assim que a mala chega ao laboratório. Neste, existe uma zona de triagem onde as amostras são separadas e levadas para a secção do laboratório onde a análise correspondente será realizada.

Em cada secção é dada a entrada da amostra respetiva no sistema informático. O técnico da secção verifica as condições da amostra, em termos de quantidade e qualidade, para averiguar se existem não conformidades (identificação incorreta do tubo, falta de produto para análise, agregados plaquetares, etc) que, caso existam, terão de ser investigadas



e registadas em documento próprio, podendo invalidar a análise em questão, sendo necessária nova colheita da amostra.

### 1.1.2. Fase analítica

Com tudo devidamente confirmado e os controlos de qualidade interno passados e validados (CQI) inicia-se a fase analítica, onde as amostras são distribuídas pelas diferentes valências e inseridas no aparelho que irá realizar a análise pedida, lendo o código de barras e automatizando o trabalho (quando não são analisadas manualmente). Nas análises realizadas manualmente (exemplo: teste rápido da mononucleose infecciosa, teste de Weil-Felix, etc), as amostras são separadas para suportes específicos e depois são realizadas seguindo uma lista de trabalho.

### 1.1.3. Fase pós-analítica

Segue-se a fase pós-analítica, em que é feita a validação dos resultados. Os aparelhos enviam diretamente os resultados para o sistema informático, onde um técnico superior valida os resultados, tendo em conta os valores de referência e o histórico clínico do utente. Quando surge um valor discordante ou de difícil interpretação é feita a repetição da análise da mesma amostra ou até pedida nova colheita ao utente, quando a amostra não está nas condições ideais ou para confirmação de resultado.

Após validação analítica, os resultados são validados por um Especialista em Análises Clínicas ou pela Diretora Técnica, que irá realizar a validação biopatológica, tendo em conta o histórico do utente e o quadro clínico do mesmo. Por fim, os boletins de resultados são impressos e colocados em envelopes, no caso de envio para o posto de colheitas, centro de saúde ou medicina do trabalho, ou são enviados por correio eletrónico, a pedido do utente.

Na tabela 2 encontra-se a lista dos aparelhos utilizados nas diferentes secções do laboratório.

*Tabela 2: Aparelhos usados no laboratório Labeto.*

<b>Nome do Equipamento e Fornecedor</b>	<b>Tipo de Análise</b>	<b>Setor</b>
Aution Max AX- 4030 Arkray	Urina II	Bioquímica Urinária
SediMax 2 A.MENARINI Diagnostics	Sedimento urinário	Bioquímica Urinária

HM-JACKarc A. MENARINI Diagnostics	Pesquisa de sangue oculto nas fezes	Bioquímica Urinária/ Fezes
Hb 9210 Resolution A.MENARINI Diagnostics	Hemoglobina Glicada	Hematologia
HA-8180V Arkray	Eletroforese da Hemoglobina	Hematologia
Wadiana Grifols	Grupo Sanguíneo Coombs Direto Coombs Indireto	Hematologia e Serologia
ADVIA 2120i Siemens Healthineers  XE-2100 Sysmex	Hemograma	Hematologia
Alifax® Test I Sysmex	Velocidade de Sedimentação	Hematologia
CAPILLARYS Sebia	Eletroforese das Proteínas Imunofixação	Serologia
RAPIDLab® 348EX SIEMENS	Cálcio Ionizado	Bioquímica
Advia 2400 Siemens Healthineers	Colesterol total, c-HDL, TGO, TGP, ALP, Albumina, Bilirrubinas, Ionograma, CPK, (...)	Bioquímica
IMMULITE 2000 Siemens Healthineers	Ferritina, Folato, Vitamina B12, PCR Ultra Sensível, CMV, Hormonas, (...)	Imunologia
Advia Centaur Siemens Healthineers	Imunoensaios	Imunologia

Phadia 250 Thermo Fischer Scientific	Testes diagnósticos de alergias ImmunoCAP	Imunologia
VIDAS® bioMérieux	Ensaio imunoenzimático de confirmação	Imunologia
CS-5100 Siemens Healthineers	Tempo de Protrombina, Antitrombina-III, Anticoagulante lúpico	hemostase
Mirastainer™ II EMD Chemicals Merck	Colorações de lâminas	Microbiologia
VITEK® 2 bioMérieux	Identificação de microrganismos e Testes de Sensibilidade aos Antibióticos	Microbiologia
IF Sprinter EUROIMMUN	Imunofluorescência	Auto-Imunidade
EUROIMMUN Analyzer I- 2P EUROIMMUN	ELISA	Auto-Imunidade

## 2. Microbiologia:

A área da Microbiologia sempre me fascinou, sendo uma área extremamente abrangente, interessante e em constante evolução, pelo que desde logo escolhi esta valência para aprofundar no presente relatório. No entanto, esta acabou ser uma das áreas que menos presenciei durante o Estágio, passando cerca de 60h na mesma, participando na sementeira de produtos biológicos e processamento dos mesmos, no isolamento de microrganismos e sua identificação, exigindo um maior trabalho de pesquisa e fundamentação dos procedimentos do Laboratório. De notar que muitos dos procedimentos que vão ser mencionados são baseados nos Procedimentos Específicos do Laboratório, que constam no Manual de Qualidade do mesmo.

## 2.1. Colorações usadas em Microbiologia:

As colorações usadas na Microbiologia são a coloração de Gram (que permite diferenciar entre bactérias Gram positivas e Gram negativas, devido às diferentes características da sua parede celular, assim como a sua estrutura) e a coloração de Ziehl-Neelsen (para bacilos ácido-álcool resistentes, como é o caso das Micobactérias). No laboratório é usado um equipamento, o Mirastainer II (\*), que faz estas colorações automaticamente. Este aparelho tem vários poços onde são colocados os corantes correspondentes a cada coloração e um braço mecânico onde são colocadas as lâminas com o inóculo.

O técnico da secção faz as lâminas para pesquisa de bactérias, insere-as num suporte do braço mecânico e coloca este no braço. De seguida, adiciona os poços com os corantes da coloração pretendida e seleciona o programa do aparelho que faz esta coloração (o aparelho foi pré-programado para as diferentes colorações pelo que ao selecionar o programa pretendido, este assume os tempos necessários que as lâminas têm de ficar em cada corante).

(\*) Este aparelho foi descontinuado pelo fornecedor, pelo que não existem atualmente artigos publicados acerca do funcionamento do mesmo, apenas o manual de funcionamento do equipamento, que acompanha o mesmo.

## 2.2. Meios de cultura:

**Gelose Hecktoen:** É um meio sólido seletivo, uma vez que inibe o crescimento da microbiota normal do intestino, permitindo o crescimento de *Salmonella sp.* e *Shigella sp.* É composto por sais biliares (inibidores), 3 açúcares (lactose, salicina e sacarose), um indicador de pH (fucsina ácida e azul de bromotimol) e citrato férrico amoniacal juntamente com tiosulfato sódico, que forma um centro negro em bactérias produtoras de H<sup>2</sup>S. *Shigella sp.* apresenta-se incolor sem centro negro e a *Salmonella sp.* incolor com centro negro, permitindo a sua distinção [2].

**Caldo Tetrionato:** É um caldo de enriquecimento selectivo de *Salmonella sp.*, uma vez que contém sais biliares e tiosulfato de sódio que inibem o crescimento de outras bactérias da microbiota intestinal, apenas permitindo que as bactérias redutoras de tetrionato se

multipliquem. Para inibir o crescimento de *Proteus spp.* (que também reduz o tetracionato) são adicionados 100uL de iodo e 25uL de novobiocina (antibiótico) a este caldo [3] [4].

**Gelose MacConkey:** Este meio contém cristal violeta e sais biliares, o que permite que seja um meio selectivo de isolamento e diferenciação para bactérias Gram negativo. A fermentação da lactose pelas bactérias leva à formação de colónias vermelhas com precipitado à volta (halo de sais biliares) pela viragem do vermelho neutro (indicador de pH). As estirpes não fermentadoras de lactose dão colónias incolores ou beges.

**Gelose Manitol Salt Agar (MSA):** Este meio é selectivo para *Staphylococcus spp.* (fermentador do manitol). Este meio contém peptonas, cloreto de sódio a 7.5%, que inibe o crescimento de outras espécies não halófilas, vermelho de fenol como indicador de pH. Este meio permite ainda a diferenciação de *Staphylococcus* em coagulase positivo (colónias amarelas) e coagulase negativas (colónias vermelhas, pois não alteram a cor do vermelho de fenol) [5].

**Gelose Chocolate:** usamos a Gelose Chocolate Agar PolyVitex VCAT e a Gelose Haemophilus Chocolate da BioMérieux, que contém hemina (fator X) e dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD – fator V), além de alguns antibióticos e antifúngicos. Estas geloses diferem no tipo de antibióticos que contém: a primeira é composta por vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim, permitindo o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, a segunda contém bacitracina, inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas e a maioria das espécies de *Neisseria*.

**Gelose Sangue:** usamos o meio COS da BioMérieux, que é um meio muito nutritivo e que facilita o crescimento de bactérias exigentes, como é o caso de *Streptococcus sp.*, devido ao seu conteúdo em peptonas. A sua composição com 5% de sangue de carneiro permite identificar o tipo de hemólise dos microrganismos: a  $\alpha$ -hemólise corresponde a uma hemólise incompleta, aparecendo uma cor esverdeada em redor da colónia (ex: *Streptococcus pneumoniae*), a  $\beta$ -hemólise corresponde a uma hemólise completa, o que significa o aparecimento de uma zona transparente à volta da colónia (ex: *Streptococcus pyogenes*) ou  $\gamma$ -hemólise, que significa ausência de hemólise.

**Gelose Candida:** fornecida pela BioMérieux, este é um meio de isolamento de leveduras, devido ao substrato cromogénico de hexosaminidase que sofre hidrólise na presença do seu

indutor (presente em leveduras), resultando em colónias azuis de *Candida albicans*. Este meio contém ainda outros substratos que quando hidrolisados originam colónias rosa, típicas de *C. tropicalis*.

**Gelose Sabouraud:** é um meio sólido que favorece o crescimento de algumas espécies de fungos, devido ao seu conteúdo em peptonas, glicose e pH ajustado ajustado a aproximadamente 5.6. A este meio podem ser adicionados cloranfenicol (antibiótico que inibe a maioria das bactérias) e actidiona (inibe fungos contaminantes como *Penicillium spp.*).

**Gelose de Mueller-Hinton:** esta gelose contém 5% de sangue (de carneiro, cavalo ou outro) e é fornecida pela BioMérieux, sendo usada nos testes de sensibilidade aos antibióticos por difusão manual para *Pneumococcus spp.* e *Streptococcus spp.*, que necessitam de sangue de carneiro para crescer.

**Caldo Todd-Hewitt:** fornecido pela BioMérieux, este é um caldo com antibióticos que se torna um meio seletivo para *Streptococcus* do grupo A de Lancefield (típicos de exsudados faríngeos) e B (típicos de exsudados vaginais em mulheres grávidas), assim como de *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* metilina resistente (MRSA). São os antibióticos utilizados (ácido nalidíxico e colistina) que dão esta seletividade ao meio, inibindo o crescimento de bactérias Gram negativas.

**Meio chromID® CPS® Elite (CPSE):** fornecido pela BioMérieux, este é um meio diferencial usado para isolar bactérias provenientes de amostras urinárias, devido à sua composição em 2 substratos cromogéneos ( $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -galactosidase), um que permite revelar a atividade enzimática bacteriana e outro que se baseia na revelação do indol pelo triptofano.

**Meio chromID® Strepto B (STRB):** fornecido pela BioMérieux, este é um meio seletivo e cromogéneo para *Streptococcus* do grupo B (ex: *Streptococcus agalactiae*), onde estes crescem como colónias vermelhas.

**Meio Löwenstein-Jensen:** fornecido pela BioMérieux, este meio favorece o crescimento de micobactérias devido ao seu conteúdo em ovo, asparagina e fécula, fazendo com que as colónias de *Mycobacterium tuberculosis* tenham um aspeto típico tipo couve-flor. Sendo que esta bactéria se encontra geralmente em amostras de expetoração, antes de se proceder à

sementeira desta, é necessário fluidificar e descontaminar a mesma, de forma a eliminar a microbiota comensal, favorecendo o crescimento das Micobactérias.

### 2.3. Amostras analisadas:

#### 2.3.1. Urina:

As infeções do aparelho urinário são uma das infeções mais comuns no Homem, não sendo por isso de estranhar que o volume diário de amostras de urina que chega ao laboratório seja tão significativo. As bactérias da microbiota intestinal, podem ser: *Enterobacteriaceae* (ex: *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*), *Enterococcus sp.* ou *Staphylococcus aureus*, sendo as principais responsáveis por estas infeções, devido à sua facilidade em invadir o aparelho urinário através da uretra [6]. As mulheres estão naturalmente mais predispostas a este tipo de infeção, devido à anatomia do seu trato urinário. Aquando da invasão destas bactérias pela uretra, estas podem infetar a bexiga causando cistite ou podem subir até ao trato urinário superior, como é o caso dos rins, causando pielonefrite, uma infeção bastante mais grave.

A urina é um fluido estéril, no entanto, ao passar através da uretra durante a micção pode arrastar alguns microrganismos presentes, dificultando um possível diagnóstico de infeção. Uma vez que a colheita desta amostra é habitualmente feita pelo próprio utente, é fundamental que este siga os princípios de colheita estabelecidos, disponibilizados em papel de forma simples e que informam que este deve fazer uma higiene com água e sabão da zona genito-urinária e de seguida colher o jato intermédio da primeira urina da manhã (rejeitar o jato inicial) para um recipiente esterilizado. Caso não seja possível ou o procedimento não tenha sido respeitado, o utente deve aguardar pelo menos 2h sem urinar até fazer nova colheita [6].

Após a colheita da urina, esta deve ser transportada até ao laboratório o mais rápido possível e deverá ser semeada até uma hora após a colheita (no caso de se tratar de uma urocultura). Sempre que isso não for possível, a mesma deve ser refrigerada a 4°C e semeada em meio CPSE até 24h após a colheita [6].

O passo seguinte é a análise da urina, onde se incluem a urina tipo II ou análise sumária de urina e a urocultura. A urina tipo II consiste em 2 etapas: a análise semi-quantitativa de alguns parâmetros bioquímicos: cor, leucócitos, nitritos, urobilinogénio, proteínas, pH, hemoglobina, cetonas, bilirrubina, glicose [7] e o sedimento urinário (estimativa semi-quantitativa do número de elementos figurados presentes nas amostras, como por exemplo: leucócitos, eritrócitos, células de descamação, etc).

- **Urocultura:**

A urocultura ou urina assética consiste na pesquisa de bactérias uropatogénicas em número representativo de infeção urinária. Nas amostras para urocultura é primeiro feita a análise sumária de urina para auxiliar o diagnóstico, nomeadamente através da presença de nitritos e leucócitos.

O primeiro passo consiste na identificação das caixas de Petri, que contém o meio de cultura chromID® CPS® Elite da BioMérieux, com o código da amostra a semear, como se pode observar na Figura 1. Deste modo, a identificação presuntiva das bactérias é facilitada, devido às diferentes cores que estas apresentam no meio, de acordo com as suas características.



*Figura 1: Uroculturas em meio CPSE.*

De seguida, é inoculada a amostra com uma ansa de plástico esterilizada de 10uL, fazendo uma estria vertical central, e sem inocular novamente a ansa, espalhar a amostra fazendo estrias apertadas horizontais até ao fim da caixa, de modo a obter colónias isoladas. Rejeita-se sempre a ansa entre amostras para evitar contaminações. Por fim, guardam-se as caixas num suporte adequado e estas vão a incubar durante 18 a 24h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , para permitir o crescimento bacteriano.

Na manhã seguinte são lidas as placas semeadas para ver se houve crescimento bacteriano de acordo com o esquema indicado na Figura 2. Se o número de unidades formadoras de colónias (UFC) for inferior a  $10^4$  ou existirem 3 ou mais bactérias presentes considera-se contaminação, no caso do sedimento ser negativo. Se o sedimento for positivo (leucócitos e/ou eritrócitos  $>30$  por campo), faz-se a coloração de Gram e de Ziehl-



Neelsen. Quando a cultura é negativa ( $<10^4$ ), mas existem leucócitos e eritrócitos superiores a 15 confirma-se apenas com a coloração de Gram. Quando existem entre  $10^4$  e  $10^5$ , o resultado é duvidoso, sendo necessário analisar o sedimento, ter em atenção a sintomatologia do utente e até, por vezes, pedir nova colheita ao mesmo para confirmação do resultado. Com colónias em número igual ou superior a  $10^5$ , tratando-se de uma cultura pura, considera-se infeção.

Se a cultura não for pura, mas existir uma grande predominância de uma espécie bacteriana (número igual ou superior a  $10^4$ ), faz-se uma repicagem para novo meio e observa-se no dia seguinte. Nestes casos, o historial clínico do utente, como a presença de sintomas, a recorrência de UTI ou a toma de antibióticos nestes casos é muito importante para auxiliar o rumo a seguir.

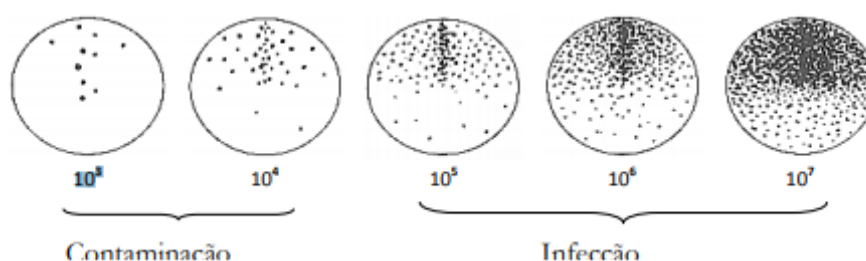


Figura 2: Quantificação de UFC em uroculturas

Após a leitura das placas são então escolhidos os sedimentos urinários correspondentes às urinas que suscitam mais dúvidas. Estes são centrifugados durante 5 minutos a 2500rpm, é retirado o sobrenadante e o sedimento é espalhado sobre 1 ou 2 lâminas (consoante vão ser feitas ambas as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen ou só Gram), para ser visto ao microscópio após coloração pelo Mirastainer II. Ao microscópio vamos procurar bactérias (quer sejam cocos, bacilos ou Micobactérias) ou leveduras em número significativo, para se poder considerar infeção.

Finalmente, todas as placas que se consideraram positivas para infeção são guardadas para se fazerem testes complementares para identificação bacteriana e testes de suscetibilidade aos antibióticos no aparelho VITEK 2, que será explicado mais à frente neste relatório.

### 2.3.2. Fezes:

A microbiota intestinal é das mais ricas existentes no ser humano, sendo única em cada pessoa. Esta é essencial na maturação do sistema imune, na proteção contra espécies

patogénicas, na regulação endócrina e muitas outras funções, sendo por isso natural que as fezes não sejam uma amostra biológica estéril. No entanto, quando existe um desequilíbrio nesta microbiota, o organismo fica vulnerável a espécies patogénicas, podendo causar infeções gastrointestinais [8], como diarreias, gastroenterites, cólera, colite hemorrágica.

A colheita das fezes para a coprocultura é feita pelo próprio utente ou por alguém responsável por este, quando este é dependente. O utente deve fazer a recolha das fezes para uma superfície lisa e limpa, usando a espátula que vem no recipiente fornecido pelo laboratório. A amostra recolhida não deve ultrapassar o tamanho de uma noz e deve ser refrigerada no recipiente estéril até ser entregue ao laboratório no próprio dia. O utente deve evitar zonas contaminadas pela urina e não usar papel higiénico na recolha, pois interfere com as análises a realizar.

Para a análise de pesquisa de sangue oculto nas fezes, a colheita deve ser feita para um kit específico que o laboratório disponibiliza aos utentes para esta análise. O utente não deve fazer a colheita se tiver hemorragias visíveis, hemorroidas, ou a menstruação, no caso de ser mulher, correndo o risco de obter falsos positivos.

- **Coprocultura:**

O exame bacteriológico ou coprocultura consiste na pesquisa de *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.* e *Staphylococcus aureus*. A pesquisa de *E. coli* enteropatogénica é feita no caso de se tratar de uma criança de idade igual ou inferior a 2 anos ou de diarreias aquosas. Se o médico suspeitar de outro microrganismo que não os indicados acima, deve solicitar uma análise para o agente(s) infeccioso(s) suspeito(s), para ser feito uma cultura em meio específico.

O primeiro passo consiste num exame microscópico com coloração de Gram para avaliar o conteúdo em bactérias Gram positivas e Gram negativas e também em leveduras.

De seguida, com uma parte da amostra de fezes, é feita uma suspensão num tubo com soro fisiológico e homogeneiza-se. A partir da suspensão, semeia-se nos meios Hecktoen, meio de enriquecimento de Tetrionato, em MSA (se o pedido do médico incluir pesquisa de *Staphylococcus aureus* ou se as fezes forem diarreicas) e em meio Sabouraud para pesquisa de leveduras, a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-48h. Em crianças de idade inferior a 2 anos semeia-se também em meio MacConkey, para pesquisa de bacilos Gram negativos.

No segundo dia faz-se a leitura dos meios. Se aparecerem colónias suspeitas de *Salmonella sp.* ou *Shigella sp.* no Hecktoen estas são repicadas para uma gelose nutritiva, permitindo o crescimento destes microrganismos ou para meio específico para *Salmonella*

*sp.*, que é usado quando se suspeita de colónias de *Salmonella sp.* no Hecktoen, durante 24h a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo depois novamente repicado para Hecktoen. Neste meio de Hecktoen, as colónias de *Salmonella sp.* aparecem incolores com um centro negro (devido à formação de ácido sulfídrico, que faz precipitar iões ferro a partir dos substratos de citrato férrico amoniacal e tiosulfato de sódio) e as colónias de *Shigella sp.* são incolores e sem centro negro, podendo, no entanto, algumas estirpes de *Salmonella sp.* também ter este aspeto.

No terceiro dia faz-se a leitura das placas que foram repicadas e a partir das placas de *Nutrient Agar* fazem-se reações de aglutinação para *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* e *E. coli* enteropatogénica. Se estas reações derem positivas, procede-se à identificação das bactérias e respetivo antibiograma no VITEK 2, a partir do meio nutritivo que serviu para o isolamento de colónia. No caso de se suspeitar de *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) não deve ser feito o antibiograma, uma vez que alguns antibióticos têm como alvo a parede bacteriana, provocando a sua destruição, o que leva à libertação da toxina e ao agravamento da situação clínica.

A pesquisa de *Campylobacter sp.* nas fezes é feita no Labeto usando um kit que deteta a presença do antígeno de *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), através de um imunoensaio cromatográfico (RIDA® QUICK *Campylobacter* da Balea). Este kit contém uma membrana com duas bandas: a banda teste e a banda controlo. A primeira encontra-se revestida com anticorpos monoclonais anti-*C. jejuni*, que estão ligados a um corante vermelho. Na banda controlo estão Acs anti-IgG humana ligados também a um corante.

Se a amostra contiver Acs de *C. jejuni*, estes vão migrar ao longo da membrana e ligar-se aos Acs da região teste, formando uma linha vermelha nessa região. Por ação capilar, a amostra vai continuar a migrar e todos os Acs ligados e não ligados vão reagir com os Acs anti-IgG da tira de controlo, onde aparece uma linha vermelha. A linha controlo vermelha indica que a realização do teste foi válida [9].

- Exame parasitológico:

Este exame consiste na observação a fresco de fezes concentradas para pesquisa de formas parasitárias, quer sejam ovos, larvas ou quistos. É recomendável que o exame seja feito em 3 amostras de fezes colhidas em dias diferentes, uma vez que a libertação de estruturas parasitárias não é contínua. No laboratório usamos um dispositivo com 3 secções diferentes, que permite que todo o processamento da amostra seja realizado num ambiente

fechado, com a ajuda de formalina que estabiliza os parasitas e os separa dos restos de comida existentes. O dispositivo contém uma espátula, que permite a recolha da amostra, um sistema de filtração que separa as fezes dos parasitas e um tubo de centrifugação, onde é colocada a espátula com a amostra. Este vai a agitar no vórtex durante um minuto e aguarda-se uma hora antes de centrifugar durante dois minutos a 1000rpm. De seguida retira-se o sobrenadante e observa-se o que se depositou ao microscópio, sendo que os parasitas e as suas estruturas são identificadas por comparação com um atlas. Os parasitas que se encontram com mais frequência são os quistos de *Giardia lamblia*, quistos de *Entamoeba coli* e *Entamoeba hartmanni*, ovos de *Enterobius vermicularis* e ovos de *Ascaris lumbricoides*.

### 2.3.3. Exsudados:

No laboratório são analisados diversos exsudados, sendo que a sua colheita é feita por um técnico, enfermeiro ou pelo próprio médico, sob as condições necessárias.

- Pesquisa de *Streptococcus* do grupo B:

A pesquisa de *Streptococcus* do grupo B (apresentam uma  $\beta$ -hemólise) é feita em mulheres grávidas, entre as 34 e 37 semanas de gestação. Esta pesquisa é feita, uma vez que estas bactérias podem colonizar as regiões genital e retal da mulher, não lhe causando qualquer problema, mas com elevado risco de infeções neonatais, devido ao contacto com estas bactérias durante o parto [10].

Assim, esta análise é realizada usando 2 zaragatoas, uma para a região vaginal e a outra para a região anal, e colocadas em meio de transporte, sendo que a mulher não deve fazer a higiene da região no dia da colheita, de forma a não causar falsos negativos. Ambas as zaragatoas são semeadas em meio líquido Todd-Hewitt durante 24h e são depois repicadas para o meio STRB, durante 48h. Se houver crescimento neste meio, as colónias suspeitas apresentam uma coloração vermelha, no entanto, para identificar com certeza que se trata de *Streptococcus* do grupo B, é feito um teste confirmatório, usando o kit PASTOREX™ STREP da BIO-RAD, que pesquisa o antígeno específico do grupo através de um antissoro que contém o anticorpo correspondente coberto por partículas de látex. Esta reação necessita de uma enzima de extração incubada durante 10min a 37° com uma diluição da bactéria para que o antígeno fique livre para a reação com o antissoro. Quando a reação é positiva observa-se aglutinação e é feita a identificação definitiva.

- **Exsudado vaginal:**

A colheita do exsudado vaginal deve obedecer a alguns princípios tais como a utente não estar menstruada, não ter relações sexuais nas 24h anteriores à colheita e não ter tomado antibiótico ou antimicótico nos 5 dias anteriores, e não fazendo a higiene no dia da colheita. O técnico responsável por fazer a colheita deve também ter em atenção se a utente está grávida, se é uma criança ou uma utente que ainda não iniciou a atividade sexual, e nestes casos não deve usar o espécuro.

Para a colheita é necessário a recolha de duas zaragatoas distintas, sendo que cada zaragatoa é introduzida até ao colo do útero. Uma das zaragatoas é seca e serve para fazer 2 lâminas (coloração de Gram e azul de metileno), para medir o pH e à qual se adiciona uma gota de soro fisiológico, para a manter hidratada quando for mantida na estufa a 37°C, para posterior exame direto para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. A outra zaragatoa é colocada em meio de transporte de carvão e será usada para semear a amostra nas Geloses de sangue (COS), Chocolate, MSA e Gelose Candida.

Quando é pedida a pesquisa de *Mycoplasma hominis/Ureaplasma spp.* ou *Chlamydia sp.*, é necessário fazer a raspagem do colo do útero, recolhendo o maior número de células possível, e a zaragatoa usada é colocada num tubo com um meio de transporte específico. No caso da pesquisa do DNA de *Chlamydia sp.* é usada uma zaragatoa seca específica. O primeiro passo a fazer é o exame direto em lâmina para observar a presença de células epiteliais, leucócitos, bactérias, leveduras e o parasita *Trichomonas vaginalis*. De seguida é feita a observação dos esfregaços com coloração de Gram (ver Figura 3, que orienta a identificação bacteriana nos diversos produtos biológicos) e azul de metileno. A sementeira nos meios acima referidos orienta para a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* (colónias transparentes em gelose de Chocolate; diplococos Gram negativo dentro e fora de leucócitos observados na coloração de Gram), *Streptococcus* do grupo B (nas grávidas), *Candida spp.* (*C. albicans* aparece com colónias azuis em gelose Candida) e *Staphylococcus* (*S. aureus* aparece com colónias amarelas em Gelose de Manitol, como se pode ver na Figura 4a).

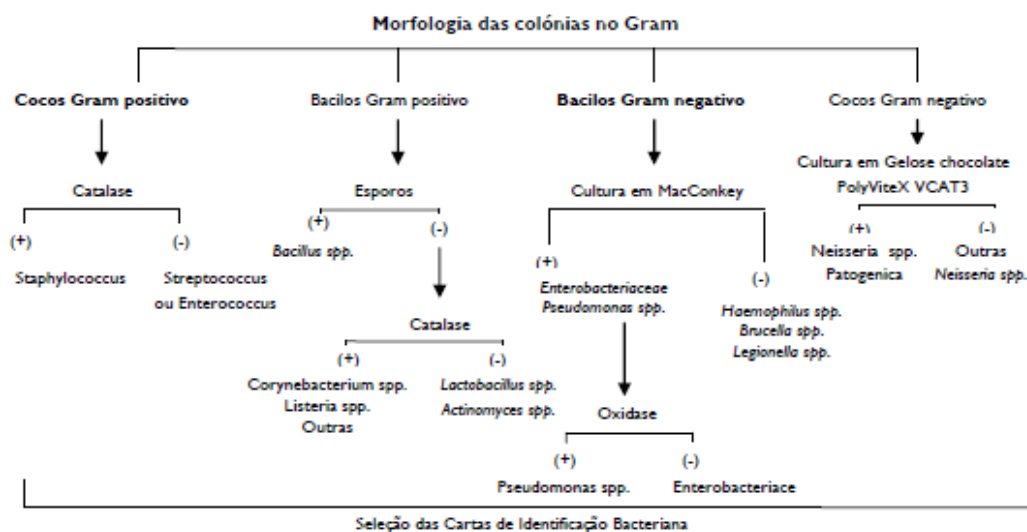


Figura 3: Esquema do procedimento para Identificação Bacteriana (Adaptado de [11]).

Para confirmar se o crescimento em gelose MSA se trata de *S. aureus*, após observação da lâmina corada por Gram, é feito o teste da catalase, para distinguir entre *Staphylococcus* sp. (catalase positivo) e *Streptococcus* sp. (catalase negativo). Este teste consiste em colocar 1 gota de  $H_2O_2$  numa lâmina e adicionar uma colónia isolada da bactéria a testar, de modo a observar formação de bolhas de oxigénio. Se houver esta formação de bolhas, estamos perante *Staphylococcus* sp. e prosseguimos com os testes complementares de identificação, como é o caso do teste da coagulase. Este é feito através do kit PASTOREX™ STAPH-PLUS, deteta a presença desta enzima, que se encontra nas estirpes de *S. aureus*, através do uso de anticorpos, ligados a partículas de látex azul, dirigidos contra as estruturas desta bactéria. Na presença de *S. aureus* observa-se aglutinação com o reagente R1 e nenhuma aglutinação com o reagente R2 (que funciona como controlo negativo), como se pode observar na Figura 4b.

A existência de bacilos Gram positivos é indicativo de bacilos de Döderlein ou lactobacilos, que são típicos da microbiota vaginal, produzindo ácido láctico que é essencial para manter o pH ácido da vagina.

O diagnóstico de *Gardnerella vaginalis* é habitualmente feito pela observação de “clue-cells” no exame microscópico, por um  $pH > 4.5$  e pelo teste da amina positivo (a adição de potassa cáustica KOH 10% à zaragatoa revela um odor característico a peixe podre). Quando este é positivo não é feito antibiograma, por não ser viável e a infeção é tratada empiricamente com metronidazol [12].



Figura 4: a) *S. aureus* em gelose MSA; b) Teste da coagulase positivo para *S. aureus*.

Quando é feita a leitura dos meios às 24h e 48h, de seguida é feita a identificação das colónias no Vitek2, recorrendo a cartas de identificação NH (*Neisseria/Haemophilus*), no caso de suspeita de *Neisseria gonorrhoeae*, sendo o respetivo antibiograma feito no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) por E-test. Na suspeita de *Streptococcus* sp. e após o teste de aglutinação PASTOREX STREP positivo, é feita identificação definitiva e o antibiograma (ATB), recorrendo a cartas próprias no Vitek2.

Para o exame micológico é semeada uma gelose Sabouraud específica, onde *C. albicans* cresce em colónias azuladas, sendo que as restantes espécies de *Candida* sp. crescem com outras cores, pelo que são identificadas no Vitek2.

- **Exsudado uretral:**

Esta colheita deve ser efetuada preferencialmente antes da primeira micção do dia ou pelo menos 3h após a última micção, não podendo ser feita a higiene matinal desta zona e o utente não deve ter relações sexuais antes da colheita.

A colheita desta amostra é maioritariamente feita a utentes do sexo masculino, onde o técnico de colheitas deve pressionar a uretra para colher a “gota matinal” com uma zaragatoa estéril, que será usada para fazer 2 lâminas para coloração de Gram e de azul de metileno, respetivamente. De seguida, tanto para utentes do sexo masculino como do sexo feminino, introduzem-se 2 zaragatoas finas e flexíveis na uretra, com um movimento rotativo, uma zaragatoa seca e a outra em meio de carvão. No caso de utentes do sexo feminino, a primeira zaragatoa é usada para fazer 2 lâminas como explicado anteriormente, assim como para fazer o exame direto (onde se coloca uma gota de soro fisiológico para não desidratar e se coloca na estufa a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  para pesquisa de *Trichomonas* sp. e para observação de células). A zaragatoa em meio de carvão é usada para a sementeira nos meios de cultura adequados: Gelose de sangue, Gelose MSA, Gelose *Candida*, Gelose de

MacConkey e Gelose Chocolate, onde é feita a sua leitura após 24h e 48 ou 72h (no caso da Gelose MSA, Gelose Candida e Gelose Chocolate). O procedimento para a identificação dos microrganismos é o seguinte:

- Observação de diplococos Gram negativo sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae* nas colorações de Gram e/ou azul de metileno e crescimento puro em gelose chocolate é feito o teste da oxidase e se positivo, prosseguir para confirmação da identificação com carta NH no Vitek2 e envio da placa semeada para o INSA, onde é feito o antibiograma;

- Cultura pura em MacConkey com odor característico de *Pseudomonas sp.*, quando em número significativo, é feito o teste da oxidase e se este for positivo, é feita a identificação com carta GN e respetivo antibiograma;

- Colónias verde-azuladas em gelose Candida identifica presuntivamente *C. albicans*, sendo feita a identificação definitiva no Vitek2, recorrendo à carta de identificação ID YST, assim como para colónias de cor branca, tratando-se de outras espécies de *Candida sp.*, onde também é necessária a identificação no Vitek2 para saber a espécie presente.

- **Exsudado faríngeo:**

A colheita deste exsudado pressupõe que o utente não tenha comido ou feito a higiene oral nessa manhã. A colheita é feita com uma zaragatoa em meio de transporte (meio de Stuart), onde esta deve ser raspada em toda a superfície da faringe e amígdalas, evitando o contacto com as gengivas, língua e saliva, de modo a evitar contaminações.

A partir desta zaragatoa é feito um esfregaço, que vai ser corado por Gram e a zaragatoa é semeada em Gelose de sangue em atmosfera de CO<sub>2</sub>( pesquisa de bactérias anaeróbias facultativas como *Streptococcus β*- hemolítico do grupo A de Lancefield, uma das principais causas de faringite), meio de Sabouraud (pesquisa de fungos), Gelose MSA (pesquisa de *Staphylococcus aureus*) e ainda em meio Todd-Hewitt (meio seletivo para *Streptococcus β*- hemolítico), sendo que este último vai ser repicado para Gelose de sangue às 24h. A leitura destes meios é feita às 24h e 48h de incubação, segundo as etapas mostradas na Figura 5.

O clínico prescritor pode ainda orientar para a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* ou *Corynebacterium diphtheriae*, sendo que estes dois últimos são semeados em meios específicos por laboratórios subcontratados.



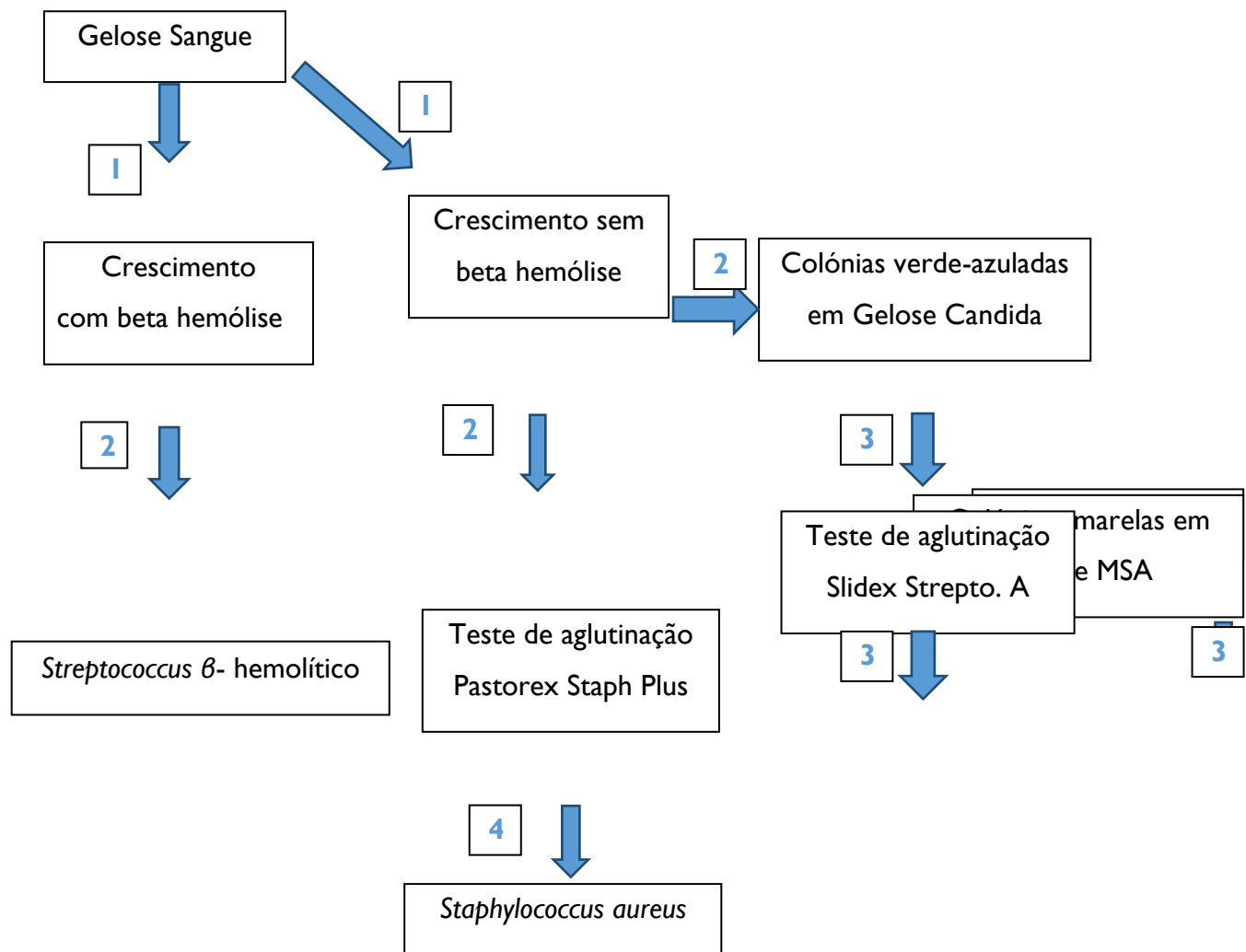


Figura 5: Esquema de leitura de placas no exsudado orofaríngeo para identificação bacteriana.

Após a identificação presuntiva, é feita a identificação definitiva no Vitek2, utilizando cartas GP (Gram positivas) para *Streptococcus beta-hemolítico* e *S. aureus*, seguido do respetivo antibiograma. No caso de se tratar de uma espécie de *Candida*, apenas é feita a identificação da espécie, informando-se o clínico da mesma.

- **Exsudado Auricular:**

Esta amostra é colhida no canal auricular externo, por um técnico, usando uma zaragatoa em meio de transporte. Esta é usada para fazer um esfregaço em lâmina, onde é feita uma coloração de Gram para observação ao microscópio e para fazer a sementeira nos meios de Gelose de Sangue (pesquisa de *Streptococcus sp.*), Gelose Candida, meio de Sabouraud simples em rampa (pesquisa de fungos filamentosos, como é o caso de *Aspergillus sp.*), Gelose MSA (pesquisa de *Staphylococcus sp.*), Gelose de MacConkey e Gelose de chocolate (sendo que estes últimos vão ser encubados em atmosfera de CO<sub>2</sub>).

Os meios são lidos às 24h e 48h, sendo que no caso de alguns fungos com crescimento lento, os meios são lidos após 5 dias. A sementeira destes meios está orientada para a pesquisa de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e leveduras e o procedimento a seguir é:

- $\alpha$ -hemólise em Gelose de Sangue, aparecem colónias com halo esverdeado, cuja identificação presuntiva sugere *S. pneumoniae*, seguida de carta de identificação e respetivo antibiograma no Vitek2;

- $\beta$ -hemólise em gelose de sangue é feito o teste Slidex Strepto. A para identificação presuntiva de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico, seguido de carta de identificação GP (será explicado no próximo capítulo) e respetivo antibiograma;

- Colónias transparentes em gelose chocolate é feita a identificação com a carta NH no Vitek2, podendo tratar-se de *Haemophilus influenzae*. O respetivo antibiograma é feito manualmente por difusão, usando o meio ATB haemo, da bioMérieux;

- Colónias amarelas em gelose MSA é feito o teste Pastorex Staph Plus para identificação presuntiva de *S. aureus*, seguido de carta de identificação GP e ATB com carta AST-619;

- Colónias verdes-azuladas em gelose Candida identifica presuntivamente *Candida albicans*, mas se obtivermos colónias brancas devemos fazer uma identificação com carta YST no Vitek2, para saber qual a espécie presente, sendo que o antibiograma apenas é feito quando requisitado pelo médico prescriptor;

- Fungos filamentosos em gelose Sabouraud são identificados por observação microscópica com o auxílio de um atlas que relaciona o aspeto macroscópico das colónias com o aspeto microscópico, sendo o antifungograma realizado no INSA;

- Colónias grandes e translúcidas em gelose MacConkey e com um cheiro característico de *Pseudomonas sp.* é feito o teste da oxidase e se este for positivo, procede-se para a identificação com carta GN e ATB.

- **Exsudado Nasal:**

Esta colheita é feita com recurso a 2 zaragatoas finas e estéreis, uma para cada narina, e colocadas em meio de transporte. A zaragatoa deve inserir-se na narina até aos cornetos nasais e deve ser rodada contra a mucosa. O utente não deve usar antibióticos ou sprays nasais até 5 dias anteriores à colheita e não deverá assoar-se nos 30 minutos antecedentes à mesma.

Com cada zaragatoa é feito um esfregaço para ser corado por coloração de Gram e a sementeira nos meios adequados: Gelose de sangue (*Streptococcus sp.*) incubado em atmosfera de CO<sub>2</sub>, Gelose MSA (*Staphylococcus aureus*), Gelose Candida (leveduras), sendo estes lidos às 24h e 48h de incubação. O procedimento a seguir após a leitura das placas está referido no tópico anterior.

- **Exsudado purulento:**

Esta colheita é aplicável a feridas e secreções, que não as mencionadas anteriormente, onde é usada uma zaragatoa estéril em meio de transporte. Esta vai servir para fazer um esfregaço em lâmina, que é corada por coloração de Gram e, posteriormente, para semear nos seguintes meios: Gelose de sangue (*Streptococcus sp.*), gelose MSA (*S. aureus*), Gelose Candida (leveduras), Gelose de MacConkey (*Enterobacteriaceae*). Se o clínico prescriptor suspeitar de outras espécies que não as acima mencionadas, este deve fazer essa referência para que se utilizem os meios de cultura mais adequados (ex: *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, geralmente associados a feridas localizadas na região genital). O procedimento a seguir após a leitura dos meios às 24h e 48h é o indicado nos tópicos anteriores.

#### 2.3.4. Expetoração:

Esta colheita deve ser feita em jejum, no período da manhã, e após lavagem com água previamente fervida e arrefecida, de modo a minimizar possíveis contaminações salivares. A recolha deve ser feita após tosse profunda e desprezando a saliva, para um contentor estéril.

A manipulação desta amostra deve ser feita numa câmara de fluxo laminar, devido ao elevado risco de contaminação para o manipulador.

Quando é feito um pedido de análise à expetoração, este pode pedir um exame bacteriológico e/ou um exame para pesquisa de micobactérias e fungos. No primeiro caso apenas é feita a sementeira nos meios de MSA (*S. aureus*), meio COS (*S. pneumoniae*), Gelose de MacConkey (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras Gram negativas), sendo lidos às 24h, 48h e 72h.

No segundo caso, em que o pedido inclui também a pesquisa de micobactérias e fungos, é feita primeiramente a análise bacteriológica acima descrita e, de seguida, faz-se uma fluidificação e descontaminação da amostra com recurso a reagentes do kit, que permite eliminar microbiota comensal. De seguida, são feitos dois esfregaços, um para corar por coloração de Gram e o outro por Ziehl-Neelsen. Esta segunda coloração serve para o

exame direto para pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), como é o caso das Micobactérias, onde se insere o *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK). As Micobactérias não crescem nos meios de cultura tradicionais, pelo que são necessários meios como o de Löwestein-Jensen para semear a amostra [13].

No caso da pesquisa de fungos filamentosos, a amostra é semeada em meio de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina, sendo lido aos 5 dias.

No caso de pesquisa de BK, a amostra é semeada no meio de Löwenstein-Jensen, a partir do sedimento do tubo centrifugado após a descontaminação, e fica a incubar 60 dias na estufa a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Ao longo deste período de incubação, vai-se observando o crescimento das colónias e devem arejar-se os tubos, aliviando a rosca, sem abrir o tubo (para entrada de algum  $\text{O}^2$ ). Quando se observa crescimento de colónias com aspeto rugoso, esbranquiçadas e tipo “couve-flor” (ver Figura 6) , deve fazer-se novo esfregaço em lâmina e corar por Ziehl-Neelsen para confirmar a presença de *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose.



Figura 6: Colónias de BK em meio Löwestein-Jensen.

### 2.3.5. Amostras para exames micológicos:

Nas amostras para a pesquisa de fungos a partir de tecidos queratinosos, quer sejam cabelo, unhas, pele ou outros, a sua colheita é feita com recurso a raspagem da zona afetada e da sua periferia para uma caixa de Petri estéril, de modo a tentar recolher fungos saprófitos e Dermatófitos (organismos que se alimentam de matéria orgânica em decomposição e queratina, respetivamente).

O primeiro passo consiste no exame direto com dissolução de um pouco da amostra numa solução de hidróxido de potássio (KOH), durante 10 a 30min, para que a queratina seja parcialmente digerida e observação ao microscópio para ver se existem leveduras ou hifas. De seguida, é feita a sementeira da amostra em meio de Sabouraud com antibióticos (cloranfenicol e gentamicina), de modo a inibir o crescimento bacteriano, em Sabouraud com actidiona e cloranfenicol, que inibe algumas leveduras e fungos contaminantes, e também em

Sabouraud líquida, sendo estes incubados durante um mês, sendo feita a observação dos mesmos a cada cinco dias. Caso se observe crescimento, faz-se uma repicagem para meio de Malte e espera-se que cresça um micélio aéreo que permita a identificação dos fungos. Além do recurso à morfologia macroscópica dos mesmos, à velocidade de crescimento, é feita a observação microscópica dos micélios, colocados sob uma lâmina com o auxílio de fita cola (para não estragar as estruturas) com uma gota de azul de lactofenol (cora estruturas fúngicas).

A exceção à sementeira em meio de cultura ocorre na suspeita de pitiríase versicolor, provocada por *Malassezia furfur*, uma vez que esta não cresce nos meios de cultura utilizados, sendo a observação direta de hifas com esporos em cacho o diagnóstico definitivo [14].

#### 2.4. Identificação bacteriana e Antibiograma:

Após a leitura dos meios e a execução dos testes complementares, segue-se a identificação definitiva das espécies e respetivo antibiograma, quando este se aplica. No Labeto estas etapas são realizadas num aparelho semiautomático, o Vitek2 da BioMérieux, que utiliza cartas com diversos substratos, no caso das cartas de identificação, e que através de reações colorimétricas revelam a espécie presente (o próprio equipamento executa os testes e faz a leitura das cartas, passando os dados diretamente para o sistema informático).

No que toca às cartas para testar a sensibilidade aos antibióticos, cada carta contém uma gama de antibióticos, de acordo com as normas EUCAST e CLSI, que se adequam a determinado grupo de bactérias, pelo que a escolha da carta adequada ao tipo de bactéria é fundamental. O equipamento dispõe ainda de um sistema avançado que incorpora as regras e fenótipos estabelecidos pelas entidades referidas anteriormente, o que leva a que sempre que surja uma resistência desconhecida, este emita um resultado incoerente, permitindo ao técnico reavaliar o tipo de carta usada ou ainda emitindo uma chamada de atenção quando surgem microrganismos alerta (por exemplo, aparecimento de novas resistências, organismos multirresistentes ou organismos de reporte obrigatório), que têm de ser reportados ao INSA e ao SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica, no qual é necessário notificar doenças de declaração obrigatória).

As amostras a serem analisadas neste aparelho são primeiramente preparadas num aparelho, o Smart Carrier do mesmo fornecedor, onde são colocados tubos para serem feitas diluições das amostras, a partir dos meios de cultura previamente semeados. O suporte funciona em poços aos pares, isto é, no primeiro poço é feita a identificação da

bactéria, num tubo inoculado a 0.5-0.63 MacFarland (para Gram positivas e Gram negativas) e no segundo poço é feito o antibiograma correspondente (ver Tabela 3).

Tabela 3: Tipo de carta de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos consoante o tipo de bactéria e o produto analisado.

Tipo de bactérias	Produto analisado	Carta de Identificação	Carta de suscetibilidade aos antimicrobianos
Bacilos Gram negativo	Urina	ID GN	AST-N359
	Outros produtos	ID GN	AST-355
<i>Pseudomonas</i> e Bacilos Gram negativos multirresistentes	-----	ID GN	AST-373
Cocos Gram positivos	-----	ID GP	AST-P648 ( <i>Staphylococcus</i> sp.), AST-P586 ( <i>Enterococcus</i> sp.) e P503 ( <i>S. agalactiae</i> , <i>Streptococcus</i> β-hemolítico)
<i>Neisseria</i> sp, <i>Haemophilus</i> sp ou <i>Moraxella</i>	-----	ID NH	-----
Leveduras	-----	ID YST	-----

### 2.5. Controlo de Qualidade:

O controlo de qualidade dos reagentes e equipamentos é fundamental para a confiança e fiabilidade dos resultados, pelo que este é um dos fatores de maior importância no Labeto. Para isso, são feitos dois tipos de controlos: o controlo interno, feito com regularidade e por comparação com valores conhecidos; e o controlo externo, feito através da participação em Programas de Avaliação Externa da Qualidade do INSA, nas áreas da Microbiologia, Micologia e Parasitologia.

O controlo de qualidade interno é feito nos corantes usados para as colorações, através do uso de estirpes referência de *S. aureus* e *E.coli*, e nos meios de cultura, usando estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*). São também usadas estas estirpes para o controlo das cartas AST do Vitek. Os testes complementares usados para a identificação presuntiva contém já nos seus kits os controlos positivos e negativos, que são testados cada vez que é feito o teste [15].

## 2.6. Caso Clínico:

Um utente do sexo masculino, com 86 anos, apresenta-se no laboratório com dores no ouvido esquerdo levando o médico a suspeitar de uma infeção. É pedido um exsudado auricular deste mesmo ouvido, que é colhido com uma zaragatoa em meio de cultura. A partir desta é feita uma lâmina para observação e são semeadas os seguintes meios: Gelose Sangue, gelose MSA e Gelose MacConkey. Ao fim de 24h foi feita a leitura dos meios e o que se observou pode ver-se na Figura 7.

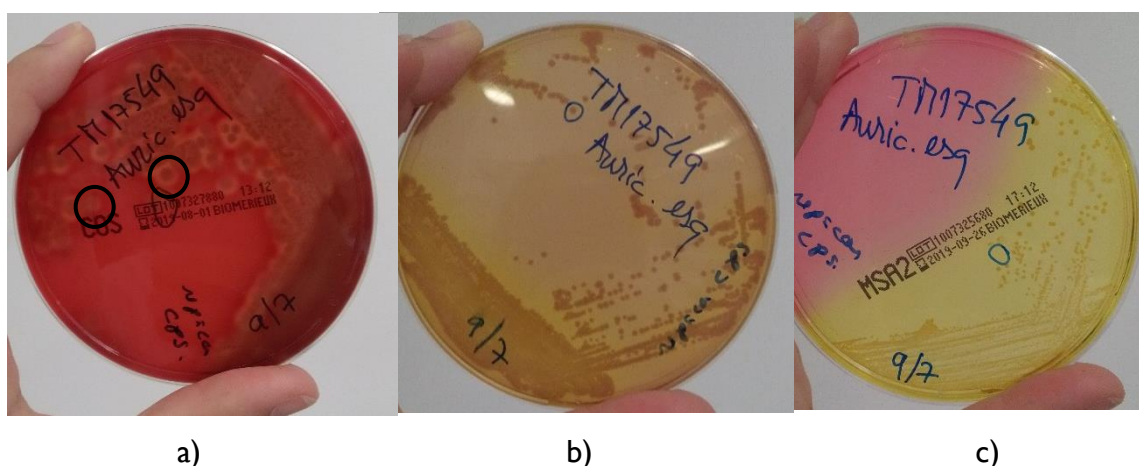


Figura 7: Leitura dos meios às 24h de incubação: a) 2 colónias distintas em COS; b) 1 tipo de colónias em Gelose MacConkey; c) 1 tipo de colónia em MSA.

Uma vez que na gelose COS se observaram dois tipos de colónias distintas, o passo seguinte foi repicar uma colónia isolada de cada para CPSE (meio cromogénico), assim como uma colónia isolada dos meios de MacConkey e MSA, ficando a incubar durante 24h.

No dia seguinte fez-se a leitura das repicagens para CPSE e obtiveram-se os resultados observados na Figura 8a.

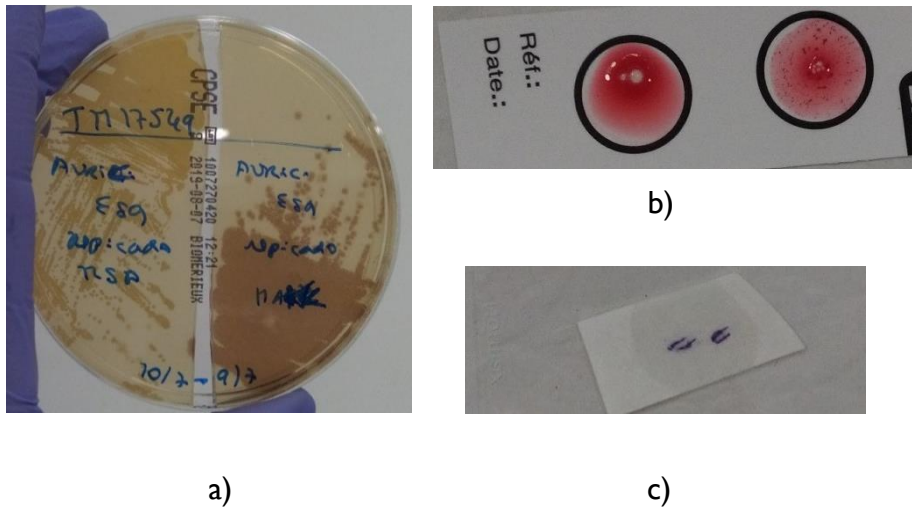


Figura 8: a) Leitura do meio CPSE após 24h; b) Teste de aglutinação STAPH. Plus positivo; c) Teste da oxidase positivo.

Após a repicagem observam-se duas colónias distintas com diferente morfologia e cor, ambas crescem em Gelose de Sangue (COS), uma vez que se trata de um meio muito rico, mas pouco seletivo. A espécie que cresce em gelose MSA, tornando o meio amarelo, é indicativo da presença de *S. aureus*, pelo que é feito o teste de aglutinação STAPH Plus, onde se obteve um resultado positivo. A Gelose de MacConkey é seletiva para bactérias Gram negativas, podendo tratar-se de uma *Enterobacteriaceae*, de *Pseudomonas sp.* ou outra espécie. Quando é feita a repicagem para CPSE, as colónias crescem com uma cor acastanhada e têm um odor característico, tipo sabonete, fazendo suspeitar de uma *Pseudomonas sp.*. Fez-se então o teste da oxidase, que deu positivo (aparece cor violeta), permitindo uma identificação presuntiva da espécie.

O passo seguinte consiste em fazer a identificação definitiva das espécies e respetivo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, recorrendo a uma carta ID GP e AST-P648 (para a primeira espécie) e a uma carta ID GN e AST-N373( para a segunda espécie). Os resultados que se obtiveram foram de encontro às nossas suspeitas:

1) A primeira espécie foi identificada como *S. aureus*, com o respetivo ATB: estirpe sensível a penicilina, meticilina, cefoxitina, gentamicina, imipenemo, vancomicina, tetraciclina, trimetoprim + sulfometoxazol e resistente a eritromicina e clindamicina.

2) A segunda espécie foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa* com o respetivo ATB: sensível a piperacilina + tazobactam, ceftazimida, aztreonam, imipenemo, meropenemo, ampicacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina e resistente a ticarcilina.



Esta espécie é naturalmente resistente à ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefazolina, cotrimazol, entre outros.

### 3. Hematologia:

Na secção da Hematologia são analisadas amostras de sangue total, obtidas para tubos com anticoagulante EDTA tripotássico. Nesta secção são feitos os hemogramas, com contagem diferencial, quantificação da hemoglobina glicada (parâmetro bioquímico), eletroforese das hemoglobinas (para deteção de hemoglobinopatias), velocidade de sedimentação e identificação do grupo sanguíneo.

### 4. Imunologia:

No laboratório Labeto, a Imunologia tem uma secção própria. No entanto, existem certas análises que são feitas com recurso a técnicas imunológicas noutras secções, como é o caso da Serologia Infeciosa e da Auto-Imunidade. No presente relatório irei focar-me nestas últimas. Para esta secção são utilizadas amostras de soro, obtidas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos, após formação e retração do coágulo.

#### 4.1. Serologia Infeciosa:

É nesta secção que se detetam anticorpos específicos para os agentes etiológicos pesquisados. Esta deteção é feita através da formação de agregados visíveis resultantes da interação dos anticorpos presentes na amostra com os antigénios específicos, que se encontram à superfície de partículas (por exemplo: partículas de carvão). Para todos estes testes são feitos controlos negativos e positivos para assegurar a validade dos resultados (controlo de qualidade interno). Sendo que não é usado qualquer aparelho automático e é tudo feito manualmente, é essencial um olho treinado para visualizar as subtis mudanças na reação.

##### 4.1.1. VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory* ou teste não treponémico)

Esta análise é pedida quando existe uma suspeita de infeção por *Treponema pallidum*, causador da sífilis, ou por rotina, em grávidas. Neste teste pretende-se pesquisar no soro do utente a presença de reaginas, que são anticorpos que reagem com cardiolípinas que se encontram à superfície de partículas de carvão do reagente.

Se o soro do utente tiver reaginas, estas vão aglutinar com o antigénio (cardiolípinas) e formar partículas visíveis suspensas na gota. Sempre que este teste der positivo, isto é,

sempre que houver aglutinação, são feitas diluições sucessivas para ser dado o resultado em título. No entanto, este teste pode originar falsos positivos, uma vez que as cardiolípinas são antigénios presentes na superfície de vários microrganismos além de *Treponema sp.*, ocorrendo então reatividade cruzada, daí que este seja um teste não treponémico. Assim, sempre que o VDRL é positivo, devem ser feitos testes treponémicos, como é o caso do TPHA (*Treponema pallidum Hemagglutination Assay*) e do FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*) [16].

#### 4.1.2. Reação de Widal

Este teste é feito quando existe uma suspeita de febre tifóide ou paratifóide, provocadas pela *Salmonella typhi* e *paratyphi*, respetivamente. Através da pesquisa de anticorpos no soro do utente, contra os antigénios O, H, A e B (os dois primeiros de *Salmonella typhi* e os segundos de *Salmonella paratyphi*). Deve fazer-se este teste para diferentes títulos de amostra, sendo que no laboratório é feito para 40µL, 20µL, 10µL e 5µL sendo o resultado dado tendo em conta o último título em que a reação foi positiva, como se pode observar nas Figuras 9 e 10 [17]. Este teste, quando positivo, deve ser confirmado com o isolamento do microrganismo numa amostra de fezes, urina ou outro.

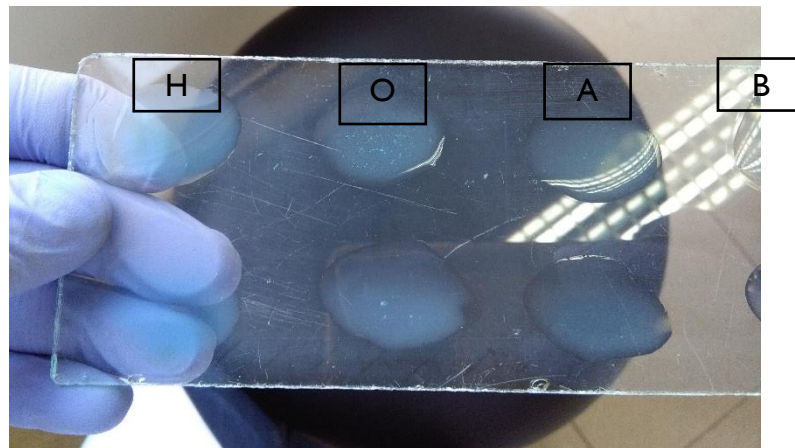


Figura 9: Reação de Widal positiva para o antigénio O.

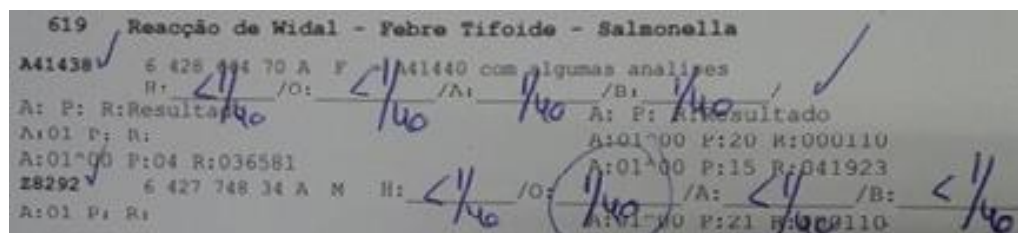


Figura 10: Resultado em título do Teste de Widal.

#### 4.1.3. Reação de Rosa Bengala

A brucelose é uma doença tipicamente zoonótica, mas que pode também afetar humanos, quando em contacto com 4 espécies bacterianas: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella canis*. O maior problema desta doença em humanos é o facto de não apresentar sintomas específicos, pelo que o diagnóstico através de testes imunológicos é fundamental, sensível e rápido e, em caso positivo, e após confirmação por outros testes, tem de ser obrigatoriamente reportado à DGS.

O primeiro passo do diagnóstico consiste no Teste de Rosa Bengala, que utiliza o antigénio de *Brucella sp.* ligado a um corante rosa. Se o soro do utente tiver aglutininas de *Brucella sp.*, o Ag ligado ao corante vai ligar-se às aglutininas e o resultado do teste é positivo. O Teste de Rosa Bengala é altamente sensível, não implicando o isolamento do microrganismo em causa, que é altamente patogénico e implica um elevado nível de segurança por parte do manipulador. No entanto, este teste quando positivo tem de ser confirmado por outros testes, como o teste de Wright (mais específico), que consiste num teste de aglutinação em tubo com diluições progressivas e que deteta Acs IgM (fase aguda da doença), embora apenas dê o resultado após 24 horas [18].

#### 4.1.4. Teste de Paul-Bunnell

O Teste de Paul-Bunnell é feito para pesquisar a presença de anticorpos heterófilos (produzidos em resposta a antigénios não específicos) no soro humano. Estes anticorpos encontram-se presentes em situações de mononucleose infecciosa, provocada pelo vírus Epstein-Barr, apesar de não serem específicos. No soro de uma pessoa saudável existem aglutininas naturais anti-hemácia de várias espécies, sendo que estas aumentam no decurso da existência de mononucleose infecciosa. No caso do teste de rastreio anterior ser positivo, é feito o *Monospot test*, que permite distinguir os anticorpos associados à mononucleose infecciosa de outros anticorpos heterófilos [18].

#### 4.1.5. Reação de Weil-Felix

Esta reação pretende pesquisar anticorpos anti-*Rickettsia* (responsáveis pela febre Q, tifo epidémico, etc) no soro humano, baseando-se numa reatividade cruzada entre estes anticorpos, produzidos em resposta a infeção aguda por *Rickettsia sp.*, e os antigénios (OX-2, OX 19 e OX-K ) de algumas estirpes de *Proteus sp.* Assim, são usados 3 reagentes, cada um

com um destes antígenos, aos quais se vai adicionar o soro do utente. Se houver aglutinação a reação é positiva [18].

#### 4.1.6. Reação de Waaler-Rose

Este teste é feito com o kit Waaler Rose Slide-Test da BioMérieux, que deteta os fatores reumatóides de classe IgM no soro humano. Os fatores reumatóides são imunoglobulinas presentes no soro de pessoas com poliartrite reumatóide e que aglutinam glóbulos vermelhos de carneiro cobertos de IgG de coelho. Os fatores reumatóides são auto-anticorpos dirigidos contra o fragmento Fc das IgG humanas

A pesquisa deste fatores é auxilia o diagnóstico da poliartrite reumatóide, apesar destes não serem específicos da doença e poderem ser encontrados em outras doenças (exemplo: lúpus eritematoso disseminado, hepatite, cirrose do fígado e sífilis).

O teste consiste num círculo onde se coloca o controlo positivo e em dois círculos onde se coloca a amostra. Ao controlo e a uma das amostras adicionamos hemácias de carneiro sensibilizadas com  $\gamma$  globulinas de carneiro e à outra amostra adicionamos hemácias de carneiro não sensibilizadas (vai permite eliminar interferências devido à presença de aglutininas naturais, funcionando como controlo negativo).

De seguida, homogeneiza-se a mistura com um agitador e observa-se o slide. A aglutinação da amostra com as hemácias sensibilizadas e a não aglutinação com as hemácias não sensibilizadas permite identificar a presença de fatores reumatóides, sendo que o controlo positivo deve sempre aglutinar, de modo a tornar o teste viável.

#### 4.2 Auto-imunidade:

Neste setor é feito o estudo serológico de doenças autoimunes e de algumas doenças infecciosas, através de técnicas manuais e automatizadas, com base na pesquisa e doseamento de anticorpos e autoanticorpos em amostras de soro. Em alguns casos, a presença de determinados autoanticorpos pode representar uma especificidade de 95% para o diagnóstico, noutros casos a especificidade é de apenas 49% ou menos.

Nesta secção, as metodologias usadas são: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Imunofluorescência Indireta e *Immunoblot*. De forma a rentabilizar o equipamento e os reagentes, a frequência de realização dos diversos parâmetros é variável. Todas as amostras não realizadas no próprio dia da colheita são refrigeradas entre os 2°C e os 8°C.

No final desta secção apresento um caso clínico que tive a oportunidade de analisar durante o período de 2 semanas em que estive nesta secção e que achei interessante apresentar.

#### 4.2.1. Doenças Autoimunes:

O Sistema Imunitário (SI) é o sistema de defesa do nosso organismo contra invasores externos, como bactérias, vírus ou parasitas. No entanto, devido a um funcionamento anormal do SI, este não distingue o “self” do “non-self” e ataca elementos do próprio organismo, como células, tecidos ou órgãos, desencadeando assim doenças autoimunes (DAI) ou até mesmo cancro. As DAI têm uma maior predominância nas mulheres (em algumas doenças são cerca de dez vezes superiores em comparação com os homens), devido à influência hormonal no SI, nomeadamente dos estrogénios. As DAI são uma das dez principais causas de morte em mulheres com menos de 65 anos [19].

As DAI podem ocorrer devido a disfunções nas células T, que atacam os tecidos do próprio organismo (ex: Diabetes *mellitus* tipo I, Artrite Reumatóide, etc), ou devido à produção de Acs pelas células B, que não reconhecem os tecidos do próprio e produzem Acs dirigidos contra o próprio organismo (ex: Lúpus Eritematoso Sistémico). É neste segundo tipo de DAI que nos focamos na secção da Autoimunidade.

Existem dois tipos de DAI: as específicas de órgão, em que os Acs produzidos têm como alvo um Ag que só existe em determinado órgão ou tecido, afetando apenas o mesmo, e as DAI sistémicas, onde os Acs têm afinidade para um Ag que se encontra presente em vários tecidos ou órgãos diferentes, pelo que a acumulação dos complexos Ag-Ac poderá provocar danos de forma generalizada [19].

#### 4.2.2. Imunoensaios usados em Autoimunidade:

- ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

No laboratório Labeto é usada a técnica de ELISA indireta para pesquisar anticorpos específicos no soro dos utentes, sendo feita no aparelho EUROIMMUN Analyzer I-2P, da EUROIMMUN. Esta técnica é usada para quantificar os Acs ENA (Antigénios Extraíveis do Núcleo), anti-dsDNA, anti-gliadina (IgA), anti-transglutaminase (IgA) e anti-cardiolipina (IgA, IgG e IgM).

Nesta técnica, a amostra diluída é incubada num poço de uma microplaca que se encontra revestido com Ag específicos para os Acs que se estão a pesquisar. Após a lavagem

para retirar os Acs que não se ligaram, é adicionado um segundo Ac conjugado com uma enzima (peroxidase), que se vai ligar ao Ac presente na amostra. Após uma segunda lavagem para remover o segundo anticorpo que não se ligou, é adicionado um substrato cromogéneo sob o qual a enzima vai atuar, resultando numa alteração da cor do meio (Figura 11). A intensidade da cor do meio vai ser proporcional à concentração dos anticorpos na amostra do utente, que pode ser quantificada através de uma curva-padrão que tem por base concentrações conhecidas de Ac e é medida por espectrofotometria.

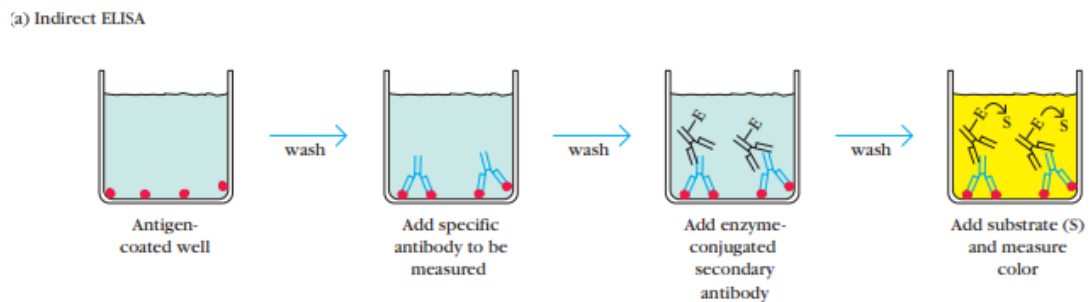


Figura 11: Esquema da técnica de ELISA indireta (Adaptado de Kuby Immunology 8ªed).

- **Imunofluorescência indireta:**

A IFI é uma técnica que usa moléculas fluorescentes ligadas a Acs anti-imunoglobulinas humanas para detetar a presença de Acs nas amostras dos utentes. Estas moléculas ou fluorocromos têm como característica o facto de absorverem a luz a um determinado comprimento de onda e de a emitirem a um comprimento de onda superior, sendo as mais usadas a fluoresceína, a ficoeritrina e a rodamina. [20]

No Labeto é usada a fluoresceína como fluoróforo, que absorve a luz a 490nm e emite a 517nm. A técnica é realizada num aparelho automático da EUROIMMUN, o EUROIMMUN IF Sprinter, que dilui as amostras em tampão PBS (1:160) e as coloca em lâminas de fluorescência que contêm substratos de Ag como células, secções de tecido ou outros elementos (Figura 12). De seguida, é adicionado o conjugado, que contém um segundo Ac marcado com a fluoresceína. Se a amostra for positiva, o Ac pesquisado liga-se ao Ag que está no substrato da lâmina, formando um complexo Ag-Ac, ao qual se vai ligar, de seguida, um segundo Ac (*fluorescein-labelled anti-human antibodies*), que permite que a fluorescência seja vista num microscópio de fluorescência e a análise semi-quantitativamente (através de titulações).

No Labeto esta técnica é usada para a pesquisa de Acs anti-Mitocondriais (AMA), anti-Nucleares (ANA), anti-Citoplasma de Neutrófilos (ANCA), anti-Músculo Liso (ASMA), anti-Células Parietais (APCA), anti-Liver/Kidney (LKM) e anti-*Treponema pallidum*.



a)

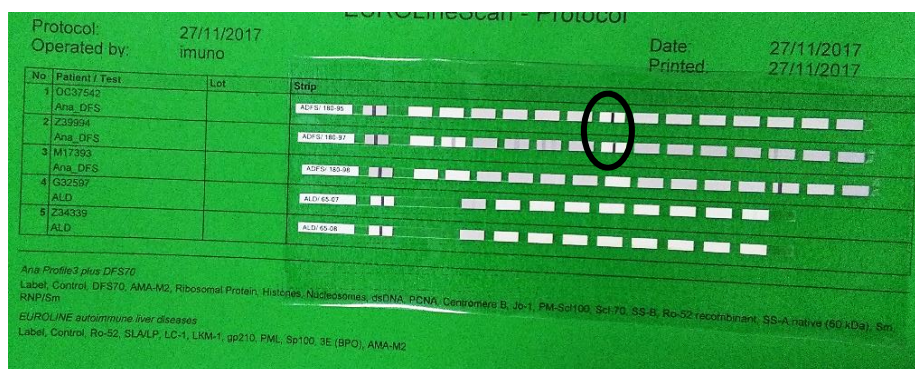
b)

Figura 12: Técnica de IFI. a) Lâmina de fluorescência com substrato; b) Aparelho de imunofluorescência EUROIMMUN IF Sprinter.

- **Immunoblot:**

Esta é uma técnica que permite a detecção de vários Acs simultaneamente, através do uso de tiras que contém Acs específicos e purificados a revestir linhas paralelas da tira. Após a diluição da amostra a analisar, esta é adicionada ao suporte onde se encontra a tira. Se a amostra contiver os Acs que se estão a pesquisar, estes vão ligar-se aos Acs que se encontram acoplados à tira, formando um complexo. Após incubação e lavagem do excesso de Acs não ligados e para este complexo poder ser detetado, é adicionado um conjugado, que contém Acs anti-IgG humanos ligados a uma HRP (*horse-radish peroxidase*). Finalmente, após nova lavagem, é adicionado um substrato cromogéneo, sob o qual a enzima atua, que altera de cor nas linhas paralelas onde se formaram complexos Ag-Ac.

No Labeto são usados diversos Immunoblots “Euroline” da EUROIMMUN. Os resultados são avaliados usando um software específico, o “EuroLineScan”, que quantifica a intensidade das bandas positivas reveladas após a adição do substrato, como se pode ver na Figura 13.



a)

**EUROLineScan - Evaluation**

Page 1 of 1

Protocol: 27/11/2017 Date: 27/11/2017  
 Operated by: imuno Printed: 27/11/2017

Patient ID Test No	EUROLINE / Allergy / EUROASSAY											Westernblot						
	Abbreviation											Results			Abbreviation			
	Intensity											Result			Intensity			
	Char														Char			
1 OC37542 Ana_DFS <i>33994</i> <i>Hist</i> <i>DNA CB</i>	ET	Ko	DFS70	M2	RIB	HI	NUDNA	PCNA	CB	Jo	PM100	Sci	SSB	52/SSA	Sm	RNP/Sm		
	ADFS:18035	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2 Z39994 Ana_DFS	ET	Ko	DFS70	M2	RIB	HI	NUDNA	PCNA	CB	Jo	PM100	Sci	SSB	52	SSA	Sm		
	ADFS:18037	-1	99	0	1	0	0	3	2	0	146	1	0	1	1	3	1	2
M17393 Ana_DFS	ET	Ko	DFS70	M2	RIB	HI	NUDNA	PCNA	CB	Jo	PM100	Sci	SSB	52	SSA	Sm		
	ADFS:18037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

b)

Figura 13: Leitura dos Immunoblots por EuroLineScan: a) Tiras de Immunoblot; b) Resultados obtidos pelo EuroLineScan.

#### 4.2.3. Testes laboratoriais associados a Doenças Autoimunes:

- Anticorpos Anti-Nucleares (ANA) por IFI:

Os AAcS ANA são um grupo heterogêneo de autoanticorpos dirigidos contra uma grande variedade de Acs do núcleo. A pesquisa destes Acs deve ser feita quando há suspeita de DAIs, pois auxilia o seu diagnóstico, juntamente com outros testes complementares (velocidade de sedimentação, proteína C reativa, proteínas do complemento, etc). Apesar de não ser específica de nenhuma DAI em particular, estes Acs encontram-se presentes no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), no Síndrome de Sjögren, na Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC), nas Dermatomiosites, na Colangite Biliar Primária (CBP), nas Escleroses, entre outras [21].

A técnica usada para a pesquisa destes AAcS é a IFI, que é o método de referência por excelência, uma vez que permite detetar simultaneamente um grande número de AAcS, através dos seus padrões de fluorescência, tendo uma sensibilidade de aproximadamente 100%. Esta técnica utiliza como substrato células HEp-2 (linha celular originária do epiteloma humano tipo 2, que tem núcleos grandes e elevada taxa de divisão, permitindo ver os núcleos em diversas fase de mitose) [21]. Os diferentes AAcS produzem um padrão de fluorescência típico, que é visualizado num microscópio de fluorescência. O componente celular no qual o Ag se encontra determina o padrão de fluorescência. Alguns padrões são



bastante sugestivos dos Acs associados, contudo é necessário a sua confirmação com testes mono-específicos, como o *Immunoblot*.

O laboratório Labeto reporta os padrões de fluorescência segundo o ICAP (*International Consensus in ANA Patterns*), onde 29 padrões distintos de fluorescência de ANA podem ser reportados (Figura 14; ver nos Anexos um quadro com um exemplo de cada padrão de fluorescência segundo o ICAP).

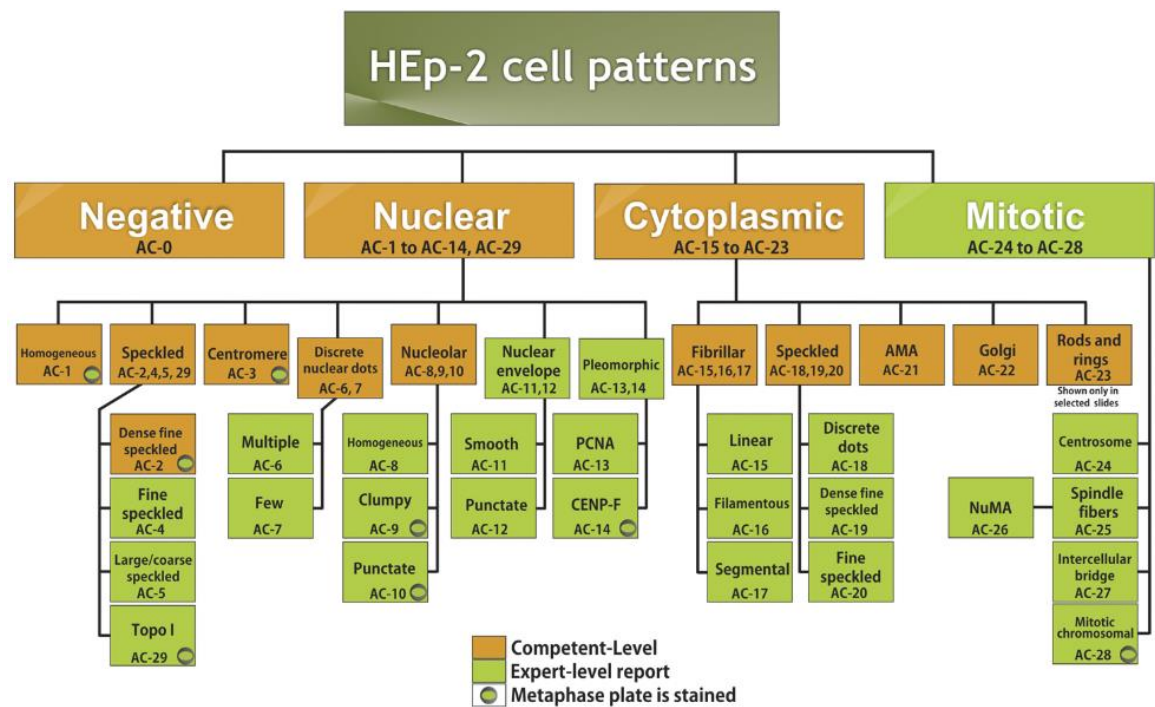


Figura 14: Padrões de fluorescência reportados pelo ICAP.

Além do padrão de fluorescência, também é reportada a titulação dos Acs detetados. As amostras são diluídas em PBS em 1:160, pelo que os resultados obtidos na fluorescência são dados em função desta diluição, isto é, como negativos ou positivos com título 1:160, 1:320, 1:640 ou >1:640. Sempre que uma amostra tem um título igual ou maior a 1:640, sem qualquer histórico, é feita nova diluição da amostra para confirmar a intensidade da fluorescência. O resultado pode ser confirmado por métodos mais específicos, como é o caso de ELISA e/ou *Immunoblot*, quando o prescritor assim o pedir, especificando então os Acs que pretende que se pesquisem.

Geralmente, títulos baixos de 1:160 podem ser detetados em certos grupos, como grávidas, idosos, doentes neoplásicos e outras patologias que não DAI, não tendo qualquer significado clínico.

- ANA por ELISA (ENA):

A determinação dos Acs ANA por ELISA permite determinar a presença de Acs anti-Nucleares Extraíveis do Núcleo (ENA) através de uma pool de 7 Ags nucleares específicos, que foram os primeiros a serem identificados: SSA (Ro), SSB, Sm, Scl-70, Jo-I, RNP e Centrômero. Esta técnica serve como um complemento à técnica de pesquisa de ANA por IFI, uma vez que permite identificar os AAcS específicos presentes na amostra do utente, podendo auxiliar o diagnóstico de uma DAI [22].

Apesar da IFI ser o método de referência para a pesquisa do ANA, existem raros casos de falsos negativos para os Acs. SSA (Ro), Jo-I e Proteína P ribossomal. Deste modo, quando estes são solicitados pelo clínico, também é executado o teste de screening de ELISA em simultâneo. Caso o resultado deste teste seja positivo, é sempre confirmado por *Immunoblot*, cuja especificidade é maior.

- ANA por *Immunoblot*:

Esta técnica é feita quando é solicitada a pesquisa individual de determinados AAcS ou para confirmação de um resultado obtido por IFI e/ ou ELISA.

No Labeto é usado o kit *Euroline ANA Profile 3* da EUROIMMUN, que contém 14 Ags diferentes na tira, permitindo identificar os AAcS que reagem com estes. São estes os Ags contidos na tira: AMA M2, Proteína P Ribossomal, Histonas, Nucleósidos, dsDNA, PCNA, CENP-B, Jo-I, PM-Scl, SS-B, SS-A, Ro-52, Sm e nRNP/Sm.

#### 4.2.3.1. Lúpus Eritematoso Sistémico:

- Anticorpos anti-dsDNA:

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma DAI sistémica que se caracteriza pela acumulação de imunocomplexos Ag-Ac nos capilares de diversos órgãos, como os rins, a pele, as articulações e o tecido sanguíneo, sendo predominante em mulheres, entre os 15 e os 40 anos. A causa para o aparecimento desta DAI ainda é desconhecida, assim como em várias outras DAIs.

O diagnóstico do LES é feito segundo critérios de diagnóstico do *American College of Rheumatology*, sendo que a presença do Ac anti-dsDNA integra estes critérios. Estes Acs têm como o alvo o DNA de dupla cadeia e são muito específicos do LES. A quantificação deste Ac é também extremamente útil na monitorização da doença em utentes já diagnosticados [23].

A determinação e quantificação destes Ac anti-dsDNA é feito no Labeto com recurso à técnica de ELISA, acima descrita. Esta quantificação é conseguida através do uso de 3 calibradores com diferentes valores do Ac, que permitem fazer uma curva padrão, sendo que o teste é considerado positivo quando o valor dos Acs é superior a 100. A determinação destes Acs por ELISA é bastante sensível, mas tem menor especificidade, pelo que um resultado positivo deve ser confirmado por um ANA positivo com mitoses positivas ou por outras técnicas mais específicas (Acs. anti-dsDNA por IFI ou por radioimunoensaio – RIA).

#### 4.2.3.2. Vasculites:

- **Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos (ANCA):**

Os Acs ANCA têm como alvo os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos e monócitos, induzindo danos necróticos a nível vascular, sendo por isso marcadores serológicos de vasculites dos pequenos vasos, como a granulomatose de Wegener e a poliangite microscópica.

As vasculites caracterizam-se por uma inflamação da parede dos vasos e posterior necrose, devido a uma acumulação de imunocomplexos, levando a situação de isquémia. Este fenómeno pode ocorrer em qualquer tipo de vaso, de qualquer órgão. Consoante o calibre do vaso afetado, as vasculites classificam-se como: Vasculites dos grandes, médios ou pequenos vasos, sendo que os ANCA são mais específicos deste último tipo [24].

No Labeto, estes Acs são detetados recorrendo a técnicas de IFI, em que o substrato usado são neutrófilos não segmentados fixados em etanol e formaldeído. O kit utilizado (fornecido pelo EUROIMMUN) contém ainda células HEp-2, para permitir uma distinção entre a fluorescência dos AAcS. ANA e dos AAcS. ANCA, que por vezes se torna difícil de diferenciar [24].

Os granulócitos fixados com etanol podem apresentar dois padrões de fluorescência, uma fluorescência granular distribuída de forma regular por todo o citoplasma (cANCA, PR3), e uma fluorescência densa em torno do núcleo, chamada de fluorescência perinuclear (pANCA, MPO), uma vez que durante a fixação das células, os seus grânulos se difundem para a membrana nuclear, originando este padrão (Figura 15 – a), b) e c)) [24]. A fixação dos granulócitos por etanol permite assim distinguir um padrão cANCA (típico da Granulomatose de Wegener) de um padrão pANCA (mais típico de poliangite microscópica).

Em granulócitos fixados com formaldeído, pode observar-se uma fluorescência granular distribuída uniformemente sobre todo o citoplasma das células. Se não houver fluorescência nos granulócitos fixados com formaldeído, podem estar presentes outros Acs., como é o caso dos Acs. anti-elastase, anti-lactoferrina, anti-lisozima,  $\beta$ -glucoronidase e catepsina G, dando então origem aos pANCA formol sensível ou pANCA atípicos, que podem estar presentes em doenças inflamatórias do intestino (ex: Colite ulcerosa, Doença de Chron ou Colangite Esclerosante Primária) [25].

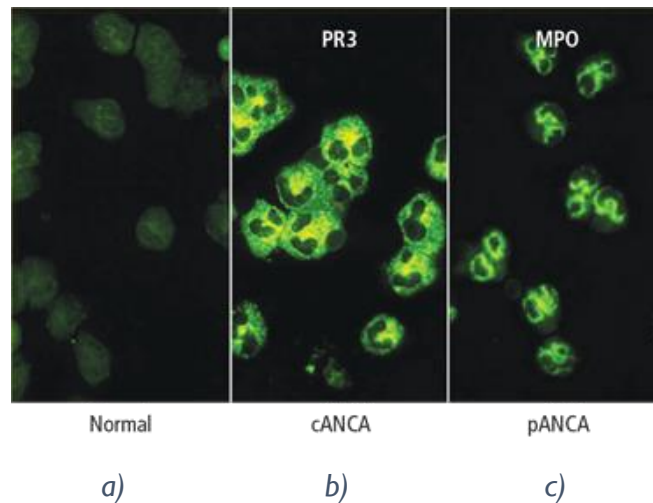


Figura 15: Padrões de fluorescência de ANCA em granulócitos fixados em etanol: a) ANCA negativo; b) cANCA; c) pANCA.

No laboratório é usado o teste de IFI da EUROIMMUN “EUROPLUS – Granulocyte Mosaic 13”. Os resultados com fluorescência positiva são confirmados com um teste monoespecífico anti-PR3 e/ou MPO (*Immunoblot*). Sempre que estamos perante um pANCA atípico reportamos esse resultado ao clínico prescritor, sugerindo a pesquisa e identificação dos Acs. ANCA ainda não pesquisados (elastase, catepsina G, lactoferrina, lisozima e *Bacterial Permeability-Increasing Protein*).

#### 4.2.3.3. Colangite Biliar Primária (CBP):

- Anticorpos Anti-Mitocôndria (AMA):

A Colangite Biliar Primária (CBP) é uma doença autoimune hepática, que se caracteriza por uma colestase crônica, devido a uma inflamação e destruição dos canais biliares causados pelo ataque das células T do indivíduo às células epiteliais hepáticas. Esta DAI ocorre maioritariamente em mulheres com idade superior a 50 anos e os sintomas principais são a fadiga, um prurido generalizado ou limitado às extremidades. Numa fase mais avançada da doença pode aparecer icterícia e secura dos olhos e da boca.

O diagnóstico serológico mais comum e específico da CBP é a pesquisa dos Anticorpos Anti-Mitocôndria (AMA), que são anticorpos heterogêneos que têm como alvo diferentes componentes mitocondriais. A detecção destes Acs faz praticamente o diagnóstico de CBP, juntamente com uma biópsia do fígado e com um valor de fosfatase alcalina continuamente elevado [26].

Atualmente são conhecidos nove Acs mitocondriais (M1 ao M9), sendo que os Acs anti-M2 (Acs anti- complexo ATPase) são os mais específicos da doença, estando presentes em 95% dos casos de CBP. A IFI pode ser a técnica usada para detetar os AAcS AMA, que apresentam um padrão de fluorescência característico, com uma marcação intensa das mitocôndrias no citoplasma das células. O substrato usado nas lâminas de fluorescência contém cortes de rim, estômago e fígado de rato (muito ricos em mitocôndrias), sendo que a fluorescência difere consoante o substrato usado (Figura 16).

A confirmação da presença destes AAcS deve ser sempre feita por outros métodos mais específicos, como a ELISA ou o *Immunoblot*.

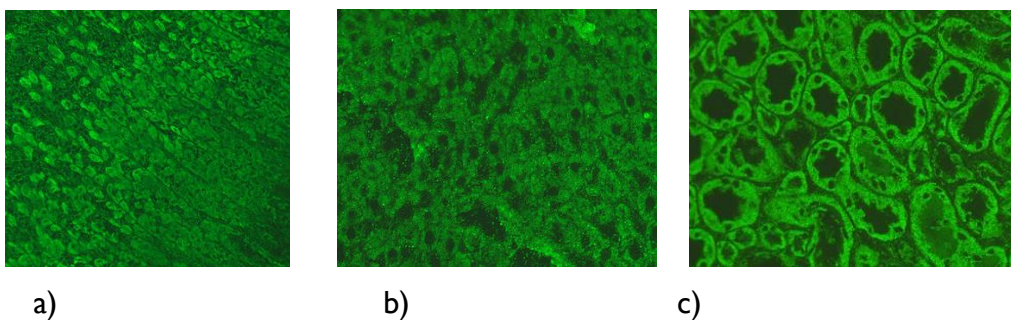


Figura 16: Padrões de fluorescência de AMA em diferentes substratos: a) Citoplasmático uniforme em corte de estômago; b) Granular em corte de fígado; c) Granular em corte de rim.

#### 4.2.3.4. Hepatite Autoimune:

A Hepatite Autoimune (HAI) é uma doença crônica, de causa desconhecida, que se caracteriza pela inflamação e possível necrose dos hepatócitos, podendo progredir para cirrose, quando não diagnosticada e tratada numa fase inicial. Este tratamento inclui terapêutica imunossupressiva, toma de corticóides, resultando numa remissão clínica da doença [27].

Como a maioria das DAI, esta doença tem maior prevalência nas mulheres e pode haver suspeita desta quando surgem simultaneamente aumentos das transaminases, elevados títulos de Acs específicos e hipergamaglobulinémia. Nestes casos, é feito um exame histológico

complementar ao fígado e se este apresentar alterações podemos considerar que estamos perante uma HAI, se não houver elementos que indiquem outras causas de hepatite.

A HAI pode ser de 2 tipos, consoante os AAcs associados: a HAI tipo I apresenta Anticorpos Anti-Músculo Liso (ASMA) e a HAI tipo II apresenta Anticorpos Anti-Microsomas de Fígado e Renais (LKMI). A presença destes Acs no soro dos utentes é de extrema importância para o diagnóstico da doença, juntamente com a análise aos parâmetros bioquímicos acima referida.

- **Anticorpos Anti-Músculo Liso (ASMA):**

Os ASMA são Acs que têm como alvo a actina, um componente do citoesqueleto. Os Acs anti-actina, especificamente actina-F são os mais comuns em casos de HAI tipo I, sendo por isso, marcadores desta [27].

A pesquisa destes Acs é feita com recurso a IFI, onde são usados como substrato cortes de fígado, estômago e rim de rato, e células VSM47 (*Vascular Smooth Muscle*) que se caracterizam por padrões de fluorescência específicos (Figura 13). No Labeto usamos o kit da EUROIMMUN "Liver Mosaic 9". Para estes AAcs não existem testes monoespecíficos, uma vez que a actina-F se trata de uma estrutura tridimensional, que ao ser isolada perde essa estrutura, essencial para a ligação com o anticorpo.

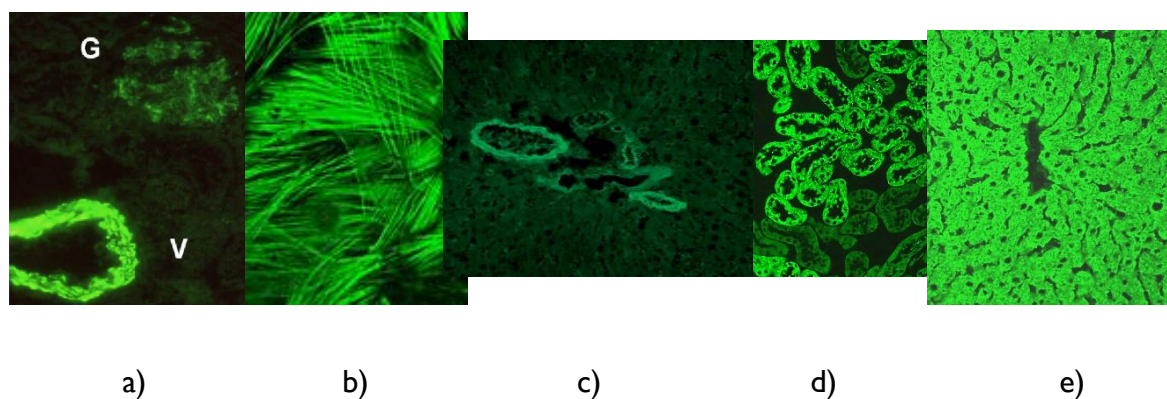


Figura 17: Padrões de fluorescência em ASMA (a,b,c) e LKMI (d,e) em diferentes substratos: a) Fluorescência nos vasos e glomérulos em rim de rato; b) Fluorescência nos filamentos de F-actina em células VSM47; c) Fluorescência nos vasos em fígado de rato; d) Fígado de rato; e) Rim de rato.

- **Anticorpos anti-Liver Kidney Microsomes (LKM):**

Os Acs anti-liver-kidney microsomes são um grupo de Acs com elevada afinidade para estruturas citoplasmáticas dos hepatócitos e dos túbulos renais. Conhecem-se atualmente

quatro tipos destes Acs: o LKMI, LKM2, LKM3 e LKM4, uma vez que têm Acs alvo diferentes [28].

Os LKMI são os mais específicos de HAI tipo II, podendo, por vezes, estar presentes também em casos de Hepatite viral, Anemia Perniciosa, Doença Celíaca e Anemia Hemolítica Autoimune.

A pesquisa destes Acs. é feita com recurso a IFI, onde é usado o mesmo kit para a pesquisa dos Acs ASMA, cujos principais substratos avaliados são (Figuras 17d, 17e):

- Fígado de rato: onde a fluorescência é muito intensa no citoplasma dos hepatócitos, originando uma zona escura e sem fluorescência nos respetivos núcleos e tecido envolvente;
- Rim de rato: onde a fluorescência é homogénea por todo o citoplasma das células tubulares proximais, havendo uma ausência de fluorescência nas células tubulares distais.

#### 4.2.3.5. Anemia Perniciosa:

- **Anticorpos Anti-Células Parietais Gástricas (APCA):**

A Anemia Perniciosa (AP) é uma doença que consiste numa deficiente absorção de vitamina B12, essencial à eritropoiese, resultando em anemias megaloblásticas. Esta mal absorção deve-se a uma lesão das células parietais gástricas causada por uma reação com AAcs.

Estes AAcs têm como alvo o Fator Intrínseco (FI) e as próprias células parietais gástricas. O FI é uma proteína sintetizada nas células referidas anteriormente e cuja função é ligar-se à vitamina B12 para que esta seja absorvida pelo organismo [29].

A anemia perniciosa está diretamente relacionada com a gastrite autoimune, cuja destruição da mucosa gástrica leva a uma diminuição do FI e conseqüentemente da vitamina B12.

A presença de APCA no soro permite um diagnóstico precoce da AP e de gastrite autoimune, sendo bastante útil no rastreio destas doenças. Por outro lado, os APCA podem aparecer em utentes saudáveis, pelo que apresentam elevada sensibilidade mas pouca especificidade para AP, sendo necessários testes complementares para o diagnóstico da mesma.

A técnica usada para a deteção destes AAcs é a IFI, e o substrato utilizado contém cortes de estômago de rato (kit da EUROIMMUN “*Liver Mosaic 9*”), onde se observa uma fluorescência granular densa apenas no citoplasma das células parietais.

Ao contrário das APCA, os Acs anti-FI são altamente específicos para AP, no entanto, nem todos os indivíduos com esta patologia são positivos para este Ac, explicando a baixa

sensibilidade do teste. Os Acs. anti-Fl apenas podem ser detetados pela técnica de *Immunoblot*, uma vez que se trata de uma molécula e não de uma estrutura celular/tecido.

#### 4.2.3.6. Doença celíaca:

- **Anticorpos anti-Endomísio, anti-Transglutaminase e anti-Gliadina:**

A Doença Celíaca (DC) é uma doença autoimune do intestino, que é induzida pela ingestão de glúten em indivíduos com uma predisposição genética para a mesma, isto é, que sejam portadores dos alelos HLA (*Human Leucocyte Antigen*) DQAI/DQBI. Esta DAI provoca inflamação e atrofia das vilosidades da mucosa intestinal, levando a uma mal absorção de certos nutrientes. No entanto, esta condição pode ser revertida quando se elimina por completo o glúten da dieta, geralmente encontrada em diversos cereais como o trigo, a cevada e o centeio [30].

O glúten é uma mistura de proteínas que se dividem em prolaminas (ex: gliadina) e glutelinas. Uma vez que existe uma elevada concentração destas proteínas no glúten, estas são parcialmente degradadas em proteínas de menor dimensão e reabsorvidas na mucosa intestinal. A glutamina, presente na gliadina, é convertida em ácido glutâmico, na mucosa intestinal, pela enzima tecidual transglutaminase (tTG), através de um processo de desaminação. Este processo facilita a ligação dos componentes da gliadina às glicoproteínas codificadas pelos genes HLA-DQAI/DQBI, que vão ser reconhecidos por recetores das células T na mucosa intestinal. Nos indivíduos com estes alelos, vai ser desencadeada uma resposta do SI, que leva à produção de Acs anti-gliadina (anti-AGA), anti transglutaminase (anti-tTG) e anti-endomísio (anti-EmA), causando lesões na mucosa do intestino delgado [30].

Para se fazer o diagnóstico serológico desta DAI é feito o doseamento da IgA e a pesquisa dos Acs anti-tTG, anti-AGA e anti-EmA (IgA e IgG), sendo os dois primeiros pesquisados com recurso a técnicas de ELISA e o último por IFI.

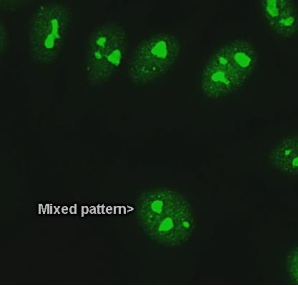
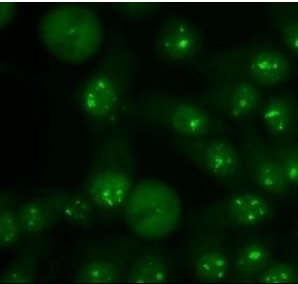
Quando o doseamento da IgA dá um valor baixo, temos de ter este valor em conta na pesquisa dos Acs específicos para não obtermos falsos negativos. Nestes casos é feita a pesquisa dos Acs da classe IgG. A presença de Acs anti-EmA e anti-tTG da classe IgA é altamente específica para DC, e auxilia também na monitorização da mesma em doentes a fazer dieta restrita em glúten. O diagnóstico definitivo é feito com recurso a uma biópsia da mucosa intestinal, após ser detetada a presença destes AAc.



#### 4.2.4. Caso Clínico:

Homem de 51 anos chega ao laboratório para fazer as análises pedidas pelo médico, onde existem análises de rotina e também análises a parâmetros imunológicos marcadores de inflamação. O histórico do utente não referia qualquer doença e a única medicação que faz é um protetor do estômago. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4:

Tabela 4: Resultados das análises feitas a homem de 51 anos e respetivos valores de referência.

Análise	Resultado	Valor de referência:
Velocidade de Sedimentação	12	0-25 mm
Proteína C Reativa	0.03	<0.50 mg/dL
Ac anti-Fator Reumatóide	<9	<14 UI/mL
ANA- Acs anti-Nucleares e Citoplasmáticos	<p><b>Positivo</b>            Padrão: Nucleolar pontilhado (NOR) + Nuclear fino granular (FG)            Título: NOR (1:640), FG (1:320)            Nucléolos: positivos            Mitoses: positivas            Citoplasma: negativo</p>  	< 1:160

Após interpretação destes resultados e tendo em conta o histórico do utente, foi feita uma diluição da amostra para a análise dos AAcS ANA, uma vez que apresentou um título elevado sem qualquer antecedente. Após diluição, o resultado manteve-se com o título de 1:640 para o padrão NOR (*Nucleolar Organizing Region*) e de 1:320 para o padrão FG (fino granular), o que sugere uma possível DAI.

O padrão NOR é raro e difícil de distinguir, estando associado ao Ag RNA polimerase I. Este padrão pode estar presente em casos de Síndrome de Sjögren, LES ou AR.

O padrão FG, pelo contrário, é um padrão muito comum, no entanto, pouco específico, podendo estar associado a LES, Síndrome de Sjögren ou esclerodermia [31].

Este resultado deve ser sempre avaliado de acordo com o contexto clínico do utente e recomendado um *follow-up* para controlo do utente, uma vez que os restantes parâmetros não se encontram alterados.

Este caso clínico é um exemplo de que nem sempre um resultado fortemente positivo (1:640) é conclusivo da existência de uma DAI no presente, podendo em alguns casos manifestar-se mais tarde. O papel do clínico é fundamental para a interpretação correta deste resultado, uma vez que só este tem acesso a todos os dados do utente, podendo ou não valorizá-lo.

#### 4.2.5. Controlo de Qualidade (CQ):

O Controlo de Qualidade é fundamental em qualquer laboratório, pois permite que exista confiança e fiabilidade nos resultados obtidos e apresentados no boletim. Este controlo consiste em diversas ferramentas tais como o Manual de Qualidade, os programas de manutenção e calibração dos equipamentos, fornecidos pelos respetivos fornecedores e a participação em Programas de Avaliação de Controlo de Qualidade, tanto interno como externo.

Um dos grandes objetivos do Labeto é apostar continuamente na qualidade e melhoria na prestação dos seus serviços e para isso participa regularmente nestes programas de avaliação da qualidade, que permitem: analisar os resultados obtidos e comparar com os resultados e métodos usados por outros laboratórios, corrigir possíveis fontes de erro, perceber o que pode ser melhorado e ainda quais as melhores metodologias e equipamentos a usar para determinada análise.

No setor da Autoimunidade são efetuados controlos internos diariamente em todos os parâmetros, sempre que estes são analisados. Estes controlos consistem num controlo positivo e num controlo negativo, que tanto podem fazer parte dos kits dos fornecedores, como serem amostras previamente analisadas e cujo valor é conhecido. No caso dos controlos externos, estes são efetuados semestralmente, através da participação em programas de avaliação externa da EUROIMMUN.

## Conclusões:

A área das Análises Clínicas está em constante crescimento e evolução, devido à importância clínica das mesmas e ao aparecimento de cada vez mais marcadores com elevada especificidade. Assim sendo, é essencial que o laboratório Labeto se mantenha na vanguarda, atualizando os equipamentos usados, de modo a processar um maior número de amostras num curto espaço de tempo, a rentabilizar os reagentes e aparelhos e a obter resultados com maior rapidez e confiança. Deste modo, é inevitável o uso de aparelhos automáticos e semi-automáticos, com elevado poder de processamento, que agilizam a rotina laboratorial, de modo a rentabilizar todos os fatores acima mencionados, mas com uma contrapartida, o trabalho deixa de ser feito manualmente, o que significa que os recursos humanos têm tendência a diminuir dentro de um laboratório.

Este Estágio Curricular foi para mim muito mais do que alguma vez imaginei, foi o culminar de dois anos de estudo intenso, de autossuperação e de aquisição de conhecimentos completamente novos.

Através da realização deste Estágio na empresa Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, SA., tive o privilégio e a oportunidade de trabalhar com pessoas fantásticas que diariamente me ajudaram a aplicar os conhecimentos teóricos na prática laboratorial, me deram ferramentas e métodos de trabalho, de forma a maximizar o tempo, reagentes e material e a adquirir autonomia no laboratório.

Uma particularidade deste Estágio que considero bastante positiva foi o facto de ter participado em todas as fases de um dia de trabalho desde a receção dos utentes, à colheita das variadas amostras, transporte das mesmas até ao laboratório, processamento e análise das amostras e posterior validação. Esta rotina permitiu-me entender o funcionamento detalhado do laboratório como um todo, interligando assim as diversas fases de um dia de trabalho e a importância das mesmas para um resultado final de confiança. No entanto, sinto que essa foi também uma desvantagem, no sentido em que estive em postos de colheitas durante grande parte do período da manhã, não tendo oportunidade de estar no laboratório a aprender o trabalho que é feito durante este período, nomeadamente na área da Microbiologia, durante o qual é realizada a leitura das placas semeadas e identificação bacteriana presente nas mesmas.

Numa situação futura, sugiro que exista um plano de estágio inicial, que descreva o tempo de permanência e etapas a realizar em cada secção laboratorial, permitindo uma

distribuição igualitária do tempo de estágio e consolidação das diversas metodologias, uma vez que no meu caso não aconteceu e considero que seria ótimo como orientação.

## Bibliografia

- [1] J. SILVA, S. BEATO e F. RODRIGUES, “Anticoagulantes & Tubos de colheita”.
- [2] S. KING e W. METZGER, “A New Plating Medium for the Isolation of Enteric Pathogens,” *American Society for Microbiology*, vol. 16, pp. 577-578, 1968.
- [3] L. JEFFRIES, “Novobiocin-Tetrathionate Broth: A Medium of improved selectivity for the isolation of Salmonellae from faeces.,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 12, pp. 568-571, 1959.
- [4] S. PALUMBO e J. ALFORD, “Inhibitory Action of Tetrathionate Enrichment Broth,” *American Society for Microbiology*, pp. 970-976, 1970.
- [5] Z. HAN, E. LAUTENBACH, N. FISHMAN e I. NACHAMKIN, “Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of meticillin-resistant Staphylococcus aureus from nasal swab specimens,” *Journal of Medical Microbiology*, vol. 56, pp. 43-46, 2006.
- [6] A. FONSECA, “Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia.,” 2004.
- [7] J. SIMERVILLE, W. MAXTED e J. PAHIRA, “Urinalysis: A Comprehensive Review,” *American Family Physician*, vol. 71, pp. 1153-1162, 2005.
- [8] S. LYNCH e O. PEDERSON, “The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease,” *New England Journal of Medicine*, vol. 375, pp. 2369-2379, 2016.
- [9] E. GALANIS, “Campylobacter and bacterial gastroenteritis.,” *CMAJ*, vol. 177, pp. 570-571, 2007.
- [10] H. WINN, “Group B Streptococcus Infection in Pregnancy,” *Clinics in Perinatology*, vol. 34, p. 387–392, 2007.
- [11] B. FORBES, D. SAHM e A. WEISSFELD, *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 12 ed., TILLE, 2007.
- [12] C. ISON, S. DAWSON, J. HILTON, G. CSONKA e E. C., “Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of Gardnerella vaginalis infection.,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 35, pp. 550-554, 1982.
- [13] E. LEE, J. BRENNAN e S. BESRA, “Mycobacterium tuberculosis Cell Envelope,” em *Tuberculosis*, Springer, 1996, pp. 1-27.
- [14] M. MARCON e D. POWELL, “Epidemiology, diagnosis, and management of Malassezia

- furfur systemic infection.,” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.*, vol. 7, pp. 161-175, 1987.
- [15] K. BERNIS, E. BOND e F. MANNING, *Resource Sharing in Biomedical Research*, 1996.
- [16] S. A. B. NAYAK, “VDRL Test and its Interpretation,” *Indian J Dermatology*, pp. 3-8, 2012.
- [17] A. SCHROEDER, “Interpretation os Serologic Tests for Typhoid Fever,” *The Journal of the American Medical Association*, vol. 206, 1968.
- [18] C. F. M. T. L. B. M. V. A. A. I. R. R. VALENTE, “Diagnóstico Serológico de Algumas Doenças Infecciosas,” *Acta Médica Portuguesa*, vol. 6, pp. 605-612, 1993.
- [19] NÚCLEO DE ESTUDOS DE DOENÇAS AUTO-IMUNES, 6 Julho 2016. [Online]. Available: [www.nedai.spmi.pt](http://www.nedai.spmi.pt).
- [20] P. JONES, S. STRANFORD, J. OWEN e J. PUNT, *Kuby Immunology*, W.H. Freeman, 2018.
- [21] T. RAMOS, “Autoimunidade: enquadramento e abordagem laboratorial,” 2017.
- [22] C. DAMOISEAUX e W. COHEN, “From ANA to ENA: How to proceed?,” *Autoimmunity Reviews*, vol. 5, pp. 10-17, 2006.
- [23] W. EGNER, “The use of laboratory testes in the diagnosis of SLE,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 53, pp. 424-432, 2000.
- [24] J. SAVIGE, D. GILLIS, E. BENSON, D. DAVIES, E. ESNAULT, R. FALK, C. HAGEN, D. JAYNE, J. JENNETE, B. PASPALIARIS, W. POLLOCK, C. PUSEY, C. SAVAGE, R. SILVESTRINI, F. WOUDE, J. WIESLANDER e A. WIJK, “International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Antibodies (ANCA),” *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 111, pp. 507-513, 1999.
- [25] A. RADICE e A. SINICO, “Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA),” *Autoimmunity*, vol. 38, pp. 93-103, 2005.
- [26] S. OERTELT, R. RIEGER, C. SELMI, P. INVERNIZZI, A. ANSARI, R. COPPEL, M. PODDA, P. LEUNG e M. GERSHWIN, “A sensitive bead assay for antimicrobial antibodies: Chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis,” *Hepatology*, vol. 45, pp. 659-665, 2007.
- [27] P. MURATORI, L. MURATORI, D. AGOSTINELLI, G. PAPPAS, L. G. A. VERONESI e F. BIANCHI, “Smooth Muscle Antibodies and Type I Autoimmune Hepatitis,” *Autoimmunity*, vol. 35, pp. 497-500, 2002.
- [28] J. HOMBERG, B. ABUAF, O. ISLAM, S. ALVAREZ, S. KHALIL e D. ALAGILLE, “Chronic

- active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type I: A second type of "autoimmune" hepatitis.," *Hepatology*, vol. 7, pp. 1333-1339, 1987.
- [29] B. TOH, I. VAN DRIEL e P. GLEESON, "Pernicious Anemia.," *England Journal of Medicine*, vol. 337, pp. 1441-1448, 1997.
- [30] A. FASANO e C. CATASSI, "Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum.," *Gastroenterology*, vol. 120, pp. 636-651, 2001.
- [31] L. SUR, E. FLOCA, D. SUR, M. COLCERIU, G. SMASCA e G. SUR, "Antinuclear Antibodies: Marker of Diagnosis and Evolution in Autoimmune Diseases.," *Laboratory Medicine*, vol. 49, pp. 62-73, 2018.
- [32] S. FIRESTEIN, "Evolving concepts of rheumatoid arthritis.," *Nature*, vol. 423, pp. 356-361, 2003.





Anexo



Quadro com os padrões de fluorescência reportados pelo ICAP.

