

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Carlos Daniel Aires de Matos Ferreira Almeida

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte
Jorge Silva e pela Doutora Luísa Maria Frazão Rodrigues e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Outubro de 2021

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Carlos Daniel Aires de Matos Ferreira Almeida

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva e pela Doutora Luísa Maria Frazão Rodrigues e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro 2021

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora interna, Professora Doutora Gabriela Silva, agradeço toda a paciência e disponibilidade para esclarecer dúvidas e agradeço também todos os conselhos dados ao longo da realização do relatório de estágio.

À minha orientadora externa, Doutora Luísa Frazão, pela oportunidade que me deu de estagiar no seu laboratório e por todos os ensinamentos e experiências que me transmitiu nos meses em que estagiei no laboratório Luísa Frazão.

À Professora Doutora Ana Miguel, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pela organização deste estágio.

A toda a equipa do laboratório, Alberto Gomes, Filipe Teixeira, Nuno Coelho, Pedro Teixeira e Sofia Ferreira, por toda a disponibilidade em esclarecer dúvidas que iam surgindo, assim como, pelos conselhos e experiência profissional que me transmitiram.

Um agradecimento especial aos meus pais, por toda a força e coragem que me transmitiram nos momentos mais complicados e também à minha namorada Maria João por toda a paciência para me escutar e por todo o apoio que me deu tanto nos momentos fáceis como difíceis desta longa caminhada.

Aos meus amigos de Viseu e amigos feitos na Universidade durante toda a caminhada até aqui, um muito obrigado por todos os momentos de humor e amizade que partilhamos nos últimos anos e que sem eles também não seria possível terminar esta aventura.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
DESCRIÇÃO do LABORATÓRIO de ANÁLISES CLÍNICAS LUÍSA	
FRAZÃO	2
MICROBIOLOGIA	4
1) Amostras.....	4
2) Receção de Amostras.....	4
3) Coloração de Gram.....	4
4) Cultura dos Microrganismos e Meios de Cultura.....	6
5) Processamento de Amostras.....	11
5.1) Urina.....	11
5.2) Fezes.....	16
5.3) Exsudados.....	18
5.4) Exame Micológico.....	19
6) Identificação de microrganismos.....	20
6.1) Provas Bioquímicas.....	20
7) Antibiograma.....	22
8) SARS-COV 2.....	24
IMUNOLOGIA	25
1) Receção e Tratamento de amostras.....	25
2) Imunoensaios.....	25
2.1) Princípios dos Imunoensaios.....	26
2.2) Métodos de Deteção de Imunocomplexos.....	28

3) Marcadores tumorais.....	30
-Alfa-Fetoproteína (AFP).....	31
- CA 125.....	32
- CA 15.3.....	33
- CA 19.9.....	33
- CEA.....	34
- hCG.....	34
- PSA.....	35
4) ImmunoCap I00 (Auto-imunidade e Alergias)	36
4.1) Auto-Imunidade	36
4.2) Imunocromatografia.....	38
4.3) Testes de Aglutinação.....	39
5) Controlo de Qualidade.....	40
BIOQUÍMICA CLÍNICA.....	42
HEMATOLOGIA.....	43
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

ABREVIATURAS

AFP- Alfa-Fetoproteína

ANAs- Anticorpos Antinucleares

ATB- Antibiograma

CA 125- Antígeno Hidrocarbonado 125, do inglês *Cancer Antigen 125*

CA 15.3-Antígeno Hidrocarbonado 15.3, do inglês *Cancer Antigen 15.3*

CA 19.9-Antígeno Hidrocarbonado 19.9, do inglês *Cancer Antigen 19.9*

CEA- Antígeno Carcinoembrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*

CLIA-*Chemiluminescent Imunoassay*

COVID-19- *Coronavirus Disease 2019*

ELFA- Ensaio de Fluorescência ligado à enzima, do inglês *Enzyme-Linked Fluorescent Assay*

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FEIA- Imunoensaio Fluoroenzimático, do inglês *Fluoroenzyme Imunoassay*

hCG- Gonadotrofina Coriônica Humana~

LES- Lúpus Eritematoso Sistêmico

PSA- Antígeno específico da Próstata, do inglês *Prostate-Specific Antigen*

SARS-COV 2- do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

Resumo

Neste relatório serão descritas as atividades realizadas no estágio curricular do último ano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio inclui as quatro valências major das análises clínicas, sendo elas, a Bioquímica, a Hematologia, a Imunologia e a Microbiologia.

O estágio curricular foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão com a orientação da Diretora Técnica do laboratório Doutora Luísa Frazão e este começou dia 7 de Janeiro de 2021 e teve a duração aproximada de 6 meses, terminando dia 7 de Julho de 2021 .

A estrutura geral do relatório conterá uma breve descrição do Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão e seu funcionamento e experiência adquirida ao longo dos meses, será feita também uma descrição dos equipamentos presentes no laboratório e de seguida uma descrição mais detalhada sobre as valências Microbiologia e Imunologia.

Abstract

In this report, the activities realized in the curricular internship on the last year of the Masters degree in Clinical Analysis of the Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra will be described.

The internship includes the four major valences of the Clinical Analysis, Biochemistry, Hematology, Immunology and Microbiology.

The internship was realized in Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão under the supervision of the technical director of the laboratory Doutora Luísa Frazão. This internship started at the 7th of January of 2021 and ended at the 7th of July of 2021, having the duration of approximately 6 months.

The report will contain a brief description of the Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão and how it works and the experience gained throughout the months that I have been there.

Additionally, it will also be described the equipment present in the laboratory and then, a more detailed description of the two valences Microbiology and Immunology.

INTRODUÇÃO

Os laboratórios de análises clínicas são parte do setor da assistência à saúde, que exerce, historicamente, um papel importante no auxílio das decisões clínicas. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico e científico alcançados, a sua complexidade também aumentou e os processos laboratoriais foram modificados e melhorados ao longo do tempo tendo em vista sempre o aperfeiçoamento daquilo que é a análise clínica e o seu correto diagnóstico de forma a ajudar o médico a tomar a melhor decisão para com cada paciente. (1)

Tendo estagiado no Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão sob orientação da Doutora Luísa Frazão foi-me pedido que aprendesse toda a fase pré-analítica desde a entrega da requisição pela parte do utente ao processo de integração da informação do paciente no sistema informático Apollo 3 até à seleção dos diferentes tubos na altura da colheita, de acordo com os diferentes testes a serem processados, a inserir os códigos de barras para serem processados nos equipamentos específicos para cada área, tudo isto da forma mais organizada possível para que o erro na fase pré-analítica seja reduzido para valores ínfimos ou nulos, visto que é nesta fase que ocorrem a maioria dos erros, seja na fase da colheita ou da identificação da amostra.

Depois foi-me pedido, com o passar do tempo e com o ganho de experiência que fui tendo que fosse começando a fazer a parte analítica em si, processando as amostras. Este processamento de amostras corresponde à fase analítica. Hoje em dia, o processamento das amostras é quase todo automatizado.

A fase pós analítica é dependente da validação dos resultados obtidos pelos equipamentos, pela parte da diretora técnica do laboratório, neste caso, pela Doutora Luísa Frazão. O processo pós analítico culmina então com a validação desses resultados e pela impressão do boletim final para entregar ao utente.

Descrição do Laboratório de Análises

Clínicas Luísa Frazão

O Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão é um laboratório de análises clínicas em Coimbra, na zona da Solum, uma zona movimentada da cidade de Coimbra.

O Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão tem uma sala de espera com sofás e uma máquina com água disponível para as pessoas que estão à espera se poderem servir, tem duas WC (uma para homens e uma para mulheres) para os utentes fazerem as suas colheitas de, urina, uma sala de colheitas para as amostras de sangue e uma sala para colheitas Covid. Tem também uma sala separada para a Biologia Molecular onde são processadas as amostras de Covid-19 e tem o laboratório em si que contém uma WC para o pessoal, uma sala administrativa e um pequeno arrumo para os pertences dos funcionários. No laboratório trabalham oito pessoas, quatro técnicos, o Filipe Teixeira, o Pedro Teixeira, o Alberto Gomes, a Sofia Ferreira, o biólogo Nuno Coelho e a diretora técnica do laboratório Luísa Frazão e o pessoal da receção, responsável pelo registo das credenciais no sistema informático.

Em média, o laboratório tem um fluxo de amostras diárias registadas de 40 a 50 amostras, dependendo também da atividade nos diferentes postos de colheita. As amostras são registadas no sistema informático Apollo 3, aparecendo depois nas folhas de trabalho para serem processadas. A cada utente é atribuído um número de processo e um número de identificação da amostra.

O laboratório apresenta as 4 valências major, Bioquímica Clínica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia, sendo que nas primeiras 3 valências, as amostras são processadas essencialmente de forma automatizada enquanto a Microbiologia envolve um trabalho mais manual.

Dentro do laboratório as áreas da Bioquímica, Hematologia e Imunologia estão no mesmo espaço físico, mas tendo sempre os aparelhos organizados de acordo com cada valência, estando, por exemplo, no setor da Hematologia o Pentra XL responsável pelos hemogramas, o ACL 9000 que faz as provas de coagulação e também o aparelho Adams A1c responsável pela determinação da hemoglobina glicada e um pouco mais separado destes mas igualmente parte deste setor está o Ves Matique que faz a determinação da Velocidade de Sedimentação globular, enquanto que a Bioquímica é essencialmente um aparelho o Beckman

Coulter AU-480 que se apresenta no canto do laboratório separado dos outros aparelhos, tal como o Beckman Coulter Unicel Dxl 600 responsável pela parte da endocrinologia e Imunologia também separado dos outros aparelhos. No centro encontra-se o Vidas e o ImmunoCap 100 , responsáveis pela parte da Imunologia.

Separadamente está a parte da Microbiologia onde ocorre o processamento de amostras biológicas como a urina, exsudados ou fezes, quer para uroculturas, coproculturas, exames parasitológicos ou exames micológicos. Dentro desta vertente enquadra-se também a realização das Sumárias de urina e da observação do sedimento urinário.

Os equipamentos, assim como, a sua respetiva valência e função, estarão dispostos na Tabela I.

Tabela I- Equipamentos utilizados no Laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão e respetiva função e valência

Valência	Equipamento	Função
Microbiologia	Aucion Max Mini Api Incubadora	Sumária de Urina Leitura dos ATBs Estufa para Microrganismos
Imunologia	Vidas ImmunoCap 100 Unicel Dxl 600	Imunoensaios Alergias e Auto-imunidade Imunoensaio
Bioquímica	Beckman-Coulter Au-480- Analisador Químico e Ionograma Unicel Dxl 600	Autoanalisador Imunoensaios
Hematologia	ACL 9000 VES Matique Pentra-XL Adams AIC	Coagulação Velocidade de Sedimentação Hemograma Hemoglobina Glicada

MICROBIOLOGIA

1) Amostras

As amostras recebidas no laboratório para a área da Microbiologia são essencialmente urina e fezes, no entanto, também chegam ao laboratório, exsudados vaginais, orofaríngeos ou nasofaríngeos. Estas amostras são processadas de forma a identificar se há algum microrganismo envolvido em algum processo infeccioso e se houver, identificar o microrganismo que está presente e fazer o seu respetivo antibiograma (ATB).

2) Receção das Amostras

Assim que chega uma amostra ao laboratório é feita uma análise à amostra de forma a verificar se está em condições de ser processada ou se será necessário pedir uma nova colheita ao utente. Por exemplo, se o frasco de urina estiver a verter ou não estiver num contentor estéril são amostras passíveis de rejeição.

3) Coloração de Gram

Após a verificação das amostras, faz-se o processamento das mesmas, iniciando por norma por um esfregaço bacteriano corado com a técnica de Gram. A técnica de Gram ou coloração de Gram foi uma técnica inventada por Hans Christian Joachim Gram e permite-nos fazer a distinção entre as bactérias que vão reter o primeiro corante Cristal Violeta e vão corar de roxo, que são designadas de Gram positivas, das que vão apresentar cor rosa denominadas de Gram negativas, permitindo para além disso observar a forma das bactérias e tipo de agrupamento.

Esta diferenciação ocorre devido às características das paredes das diferentes bactérias, em que as bactérias denominadas Gram positivas têm a sua parede constituída essencialmente por uma membrana celular, uma camada espessa de peptidoglicano ao qual se ligam ácidos teicoicos e proteínas.

As bactérias Gram negativas têm uma parede mais complexa, sendo constituída por uma membrana citoplasmática, uma camada de peptidoglicano fina, uma membrana externa composta por uma bicamada fosfolipídica e uma camada de lipopolissacarídeos (LPS).

As diferenças entre a parede das bactérias de Gram positivas e das bactérias de Gram negativo poderão ser vistas na Figura 1.

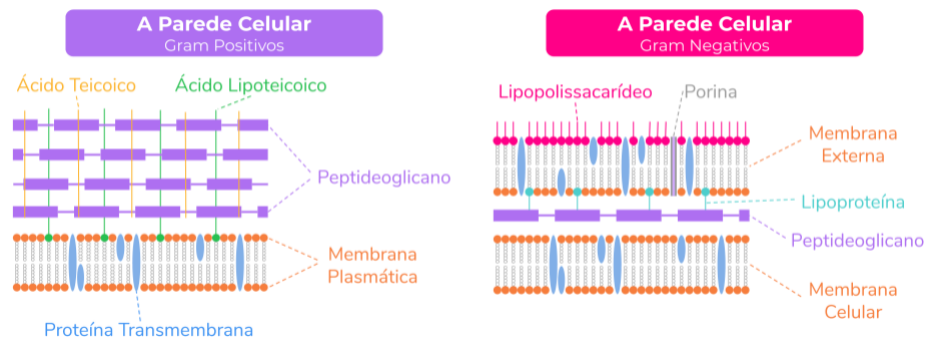


Figura 1- Diferenças entre a parede das bactérias de Gram positivo da parede das bactérias de Gram negativo. (2)

As bactérias Gram positivas apresentam a cor roxa, devido à sua espessa camada de peptidoglicano que acaba por reter o corante primário, Cristal Violeta e o mordente Soluto de Lugol. A adição do diferenciador álcool acetona não altera o tom roxo da bactéria devido a ter uma concentração reduzida de lípidos na parede celular.

As bactérias de Gram negativo ficam sem cor após a adição do diferenciador álcool acetona. Isto é devido ao facto de estas bactérias serem constituídas por uma camada fina de peptidoglicano, que desta forma impede que haja uma retenção eficaz do corante primário, e, também, por uma camada lipídica na membrana externa que é dissolvida pelo diferenciador.

Esta composição da parede, permite então que o corante primário e o mordente sejam removidos. Estas bactérias acabam por ser coradas pelo corante secundário, a Safranina, administrado após a aplicação do diferenciador, atribuindo, desta forma, a cor rosa às bactérias de Gram negativo. Todo o procedimento da coloração de Gram está descrito na Tabela II. (3)

Após o processo do esfregaço, coloração e secagem, as preparações são observadas ao microscópio ótico de campo claro na objetiva de 100x. Esta observação permite-nos fazer a distinção entre a morfologia da bactéria, coco ou bacilo, distinguir também se é uma bactéria Gram positiva ou Gram negativa, de acordo com a coloração apresentada, e ainda os diferentes agrupamentos (isolado, diplococos, estreptococos, estafilococos ou diplobacilos, por exemplo)

Tabela II-Técnica de coloração de Gram

Coloração de Gram
Esfregaço bacteriano
Cristal violeta- 1 minuto
Lavar com água destilada
Soluto de Lugol- 1 minuto
Lavar com água destilada
Álcool-Acetona- algumas gotas até descorar
Lavar com água destilada
Safranina- 1 minuto
Lavar com água destilada e secar

4) Cultura dos Microrganismos e Meios de Cultura

A cultura dos microrganismos ocorre em simultâneo com a coloração de Gram, onde se faz a identificação presuntiva do microrganismo através da sua forma (Bacilo ou coco), cor (Roxo ou rosa), agrupamento (isolado, diplococo, em cacho ou em cadeia). Com base nesse conhecimento, a cultura será feita num meio seletivo ou não seletivo, de forma a verificar os microrganismos que crescem.

No Laboratório Luísa Frazão temos diferentes tipos de meios, uns seletivos que nos permitem selecionar um grupo de bactérias específicas e que por vezes nos permite fazer a sua identificação presuntiva e outros meios não seletivos em que crescem a maior parte dos microrganismos e em que não permitem a sua identificação presuntiva.

A cultura de microrganismos é feita de forma a identificar os microrganismos presentes na amostra do paciente. Esta cultura pode ser feita em diversos tipos de meios e essa diversidade pode ser caracterizada em termos de seletividade, no sentido que há uns que são não seletivos, ou seja, não contêm qualquer tipo de inibidores e, conseqüentemente, permitem o crescimento de todos os tipos de microrganismos que se podem encontrar no organismo.

Há também meios enriquecidos que são feitos para facilitar o crescimento dos microrganismos fastidiosos. O enriquecedor primário é o sangue, que fornece nutrientes aos microrganismos e permite, dessa forma, o crescimento de todos os microrganismos, sejam eles fastidiosos ou clinicamente relevantes.

Outro tipo de meio são os meios seletivos que contêm inibidores, sejam eles componentes orgânicos ou inorgânicos, tais como o NaCl que é usado no meio MSA2 para o crescimento de estafilococos. Outros inibidores podem ser os antibióticos que inibem um grande número de microrganismos e desta forma, o antibiótico presente no meio vai alterar os microrganismos capazes de proliferar no meio de cultura. (4)

Os meios de cultura frequentemente utilizados no laboratório são:

-Meio ChromId CPS Elite

A gelose CPS Elite é um meio cromogéneo que facilita o isolamento e identificação presuntiva rápida e fiável dos agentes patogénicos mais comuns em infeções urinárias, através da característica das suas colónias, seja, pela cor, brilho ou tamanho da colónia. Este meio permite também uma carga de trabalho mais reduzida, permite poupar em material como zaragatoas e ansas como também em testes bioquímicos rápidos, tais como testes de catalase ou oxidase, que são utilizados como testes de confirmação e diferenciação de agentes microbianos. (5)

-Meio de Hektoen (Hektoen Enteric Agar)

O meio de Hektoen é um meio seletivo e diferencial utilizado no isolamento e crescimento de microrganismos Gram-negativos entéricos, mais especificamente para *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. em amostras de fezes. A capacidade seletiva deste meio provém da fórmula que contém sais biliares capazes de inibir o crescimento dos microrganismos de Gram

positivo, no entanto, tem também carácter tóxico para alguns microrganismos de Gram negativo, inibindo ou retardando o seu crescimento. A presença de lactose, sacarose, salicino e dos indicadores de pH azul de bromotimol bem como de fucsina ácida permite diferenciar os microrganismos entéricos, através da cor das colónias e do meio de cultura. Desta forma, os microrganismos não fermentadores da lactose, como *Salmonella* spp e *Shigella* spp., não alteram a cor do meio enquanto os microrganismos que acidificam o meio através da fermentação dos compostos do meio, tais como a *Escherichia coli*, alteram a cor do meio para laranja. (6)

-Caldo Selenite F

Este caldo de Selenite é um meio líquido de enriquecimento para *Salmonella* spp., utilizado essencialmente em coproculturas e sendo depois subcultivado para outros meios de cultura seletivos e diferenciais, tais como, meio de MacConkey Agar, meio Hektoen ou meio SM2, específico para *Salmonella* spp., de forma a isolar e identificar estes patogéneos. O selenito de sódio inibe o crescimento de um grande número de bactérias quer de Gram positivo como de Gram negativo. (6)

-Gelose de Chocolate com Polyvitex (PVX)

Esta gelose de chocolate trata-se de um meio enriquecido e que tem uma constituição semelhante à gelose de Columbia, no entanto, esta gelose tem uma adição de 2% de hemoglobina que providencia o fator X essencial para o crescimento de *Haemophilus* spp. e aumenta também o crescimento de *Neisseria* spp. e toda esta mistura é aquecida a 80°C promovendo a hemólise dos eritrócitos. O enriquecimento com o Polyvitex providencia o fator V para espécies de *Haemophilus* spp. e também aumenta os nutrientes para o crescimento de espécies patogénicas de *Neisseria* spp. (6)

-Meio MacConkey Agar

O meio de MacConkey é um meio seletivo e diferencial usado para o isolamento e deteção de microrganismos de Gram negativo e distingue também os bacilos de Gram negativo fermentadores de lactose dos não fermentadores da lactose.

O meio de MacConkey contém cristal violeta e sais biliares que inibem o crescimento de microrganismos de Gram positivo e favorece a proliferação dos organismos de Gram negativo. (6)

Os microrganismos fermentadores de lactose crescem muito bem no meio de MacConkey, produzem ácido que faz com que a cor do meio mude para amarelo. No caso dos microrganismos não fermentadores de lactose, estes podem crescer no meio de MacConkey, no entanto, não vão produzir o ácido e, como tal, não vão mudar a cor do meio.

-Mannitol Salt Agar (MSA2)

O meio MSA2 é um meio seletivo devido à sua elevada quantidade de cloreto de sódio (NaCl), cerca de 7,5% do meio, sendo este responsável pela inibição de praticamente todos os microrganismos que não sejam *Staphylococcus* e diferencial devido à alteração da cor que ocorre devido à fermentação de manitol. Esta fermentação do manitol, provoca a alteração de cor do meio, o que nos permite fazer a diferenciação entre o *Staphylococcus aureus* de outro tipo de *Staphylococcus* que esteja presente no meio.

No caso de estarmos na presença de *Staphylococcus aureus* este vai fermentar o manitol e como é uma bactéria coagulase positiva as suas colónias no meio serão amarelas e em seu redor estará o meio amarelado. No caso de ser outra espécie de *Staphylococcus* sendo esta espécie coagulase negativa, aparecerá de cor branca no meio e não estará circundado por meio amarelo.(6)

Desta forma, o meio permite diferenciar o *Staphylococcus aureus* de outra espécie de *Staphylococcus*.

-Meio Sabouraud com Cloranfenicol e Gentamicina (SGC2)

O meio de Sabouraud é um meio seletivo utilizado para a cultura e isolamento de fungos, sejam eles patogénicos ou não patogénicos, mais particularmente para a cultura de dermatófitos. Este meio é seletivo para fungos, visto que para além de apresentar um pH ácido que favorece o crescimento de fungos e é inibitório para o crescimento de bactérias, tem também a presença de antimicrobianos. Antimicrobianos incluem a gentamicina que inibe o

crescimento de bactérias de Gram negativo e o cloranfenicol que é inibitório para uma vasta gama de espécies bacterianas tanto Gram negativas como Gram positivas. (6)

-Meio *Candida* (CHROMagar *Candida* ou CAN)

O meio de *Candida* é um meio seletivo e diferencial utilizado para isolamento e diferenciação entre diversas espécies de *Candida*, tais como a *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Este meio permite através das diferentes morfologias das colónias e diferentes cores das colónias, perceber se se trata de um misto de leveduras ou de uma monocultura. Por exemplo, se as colónias se apresentarem com uma cor azulada, estas corresponderão a *Candida albicans*. (6)

-Gelose Columbia com sangue (COS)

A gelose de Columbia com 5% de sangue de carneiro é uma gelose muito nutritiva, utilizada normalmente para o isolamento e o crescimento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos. O sangue de carneiro permite a deteção de reações hemolíticas e fornece o factor X (heme) que é necessário para o crescimento de variadas espécies e que permite fazer a distinção dos diferentes tipos de hemólise, que permite distinguir diferentes tipos de microrganismos nomeadamente *Streptococcus* dos diversos grupos tendo em conta essa mesma hemólise. (6)

-Gelose de *Streptococcus B* (STRB)

A gelose *Streptococcus B* é uma gelose cromogénica e seletiva contra bacilos de Gram negativo, estafilococos e leveduras. Esta gelose é particularmente importante e utilizada no contexto de mulheres grávidas, de forma a verificar se estão colonizadas ou não com esta espécie bacteriana, devido a este *Streptococcus* de grupo B, tal como, o *Streptococcus agalactiae* provocar infeções neonatais graves. Esta gelose contém combinações de diferentes peptonas, três substratos cromogénicos e antibióticos e é possível identificar as colónias de *Streptococcus* de grupo B, vendo uma colónia redonda e a cor entre o rosa pálido e o vermelho. (7)

-ChromID *Salmonella* (SM2)

O meio SM2 é um seletivo, diferencial e cromogéneo que contém um substrato cromogénico para a B-galactosidase e ácido glucorónico e estes substratos permitem a deteção, isolamento e identificação de *Salmonella* spp.. (6)

O meio permite essa identificação através da coloração das colónias, no caso da *Salmonella* spp. as colónias aparecem com uma cor malva (rosa a roxo) enquanto as colónias de outras bactérias aparecem com cor verde-azulado. Isto acontece devido às diferenças metabólicas das bactérias em que há metabolização do ácido glucorónico, no caso da *Salmonella* spp., e no caso de outras enterobactérias a cor da colónia é diferente devido à ação da B-galactosidase.

-Sistema Mycoline

É um sistema que consiste numa lâmina inserida num tubo e que tem dois meios de cultura diferentes, e é essencialmente utilizado para a cultura de fungos dermatófitos. Num dos lados da lâmina contém o equivalente à gelose SGC2 que favorece o crescimento de fungos e impede o crescimento de bactérias de Gram negativo e de Gram positivo. Do outro lado da lâmina tem um meio de Sabouraud-Cloranfenicol-Actidiona que inibe o crescimento de espécies bacterianas de Gram negativo e de Gram positivo e a Actidiona inibe o crescimento dos restantes fungos filamentosos, permitindo apenas o crescimento de fungos dermatófitos.

5) Processamento de amostras

5.1) Urina

A urina é um dos produtos biológicos mais comuns que dão entrada no laboratório Luísa Frazão, principalmente para procura de possíveis infeções urinárias sejam estas de origem nosocomial, ou seja, originadas em contexto hospitalar ou infeções comunitárias.

As infeções urinárias podem ser infeções no trato urinário superior, sendo estas infeções ao nível renal, tais como, as pielonefrites (infeção no parênquima renal) e as uretrites

(infecção nos ureteres), ou infecções do trato urinário inferior, sendo que as mais comuns neste caso são as infecções na bexiga, denominadas por cistites.

As infecções urinárias podem ser originadas por várias vias, hematogénea, via linfática e a mais comum a via ascendente, sendo esta a razão pela qual as infecções urinárias são mais prevalentes nas mulheres, devido à sua anatomia, nomeadamente, ao facto de haver uma maior proximidade entre o orifício urinário e o ânus. (8;9)

A colheita da amostra de urina é feita num contentor estéril com o jato intermédio da primeira urina da manhã, tentando não contaminar a amostra com a microbiota vaginal, perianal e uretral. Para essa contaminação não ocorrer, pode ser sugerido à pessoa que faça uma lavagem na zona da micção, antes de fazer a colheita. Esta colheita, por norma, é feita pela própria pessoa, no entanto em casos da pessoa não o conseguir fazer, esta pode ser feita por profissionais de saúde, tanto por cateter como por aspiração suprapúbica, por exemplo.

O exame da urina tem duas etapas principais, sendo estas, a Análise da sumária de urina ou urina tipo II, que consiste na análise dos parâmetros bioquímicos da urina e do sedimento urinário e numa segunda etapa a Urocultura.

Análise da Sumária de Urina

Esta etapa é feita em duas fases, primeiro é processada no equipamento Aution Max, onde este pipeta a urina avalia a sua cor e a passa nas tiras do Aution que contém os diversos parâmetros bioquímicos, tais como, o pH, a densidade, o sangue, os leucócitos, a glicose, as proteínas, urobilinogénio, nitritos, bilirrubina e cetonas, sendo todos estes parâmetros avaliados segundo reações colorimétricas.

A seguir ao processamento dos tubos de urina no Aution Max, estas urinas são centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm, de forma a obter o sedimento urinário.

O sedimento urinário é depois observado ao microscópio ótico de campo claro com a objetiva de 40x na preparação a fresco, e devemos observar a possível existência de leucócitos, células epiteliais, eritrócitos, cristais, cilindros, microrganismos e outros elementos anormais na urina. Devemos sempre observar pelo menos 9 a 10 campos diferentes da mesma lâmina.

Urocultura

A urocultura consiste em semear a urina em meios de cultura de modo a quantificar os microrganismos nela presentes e a identificar os mesmos. No laboratório de Análises Clínicas Luísa Frazão o meio que se usa para semear as urinas é o meio CPSE, essencialmente, por permitir tanto a quantificação dos microrganismos como a sua identificação com base na cor e na forma das colónias, permitindo este meio que se poupe tempo a fazer a urocultura e o seu respetivo antibiograma. Assim que se faz a sementeira, as placas são incubadas a 37°C durante um período de cerca de 24 horas, e posteriormente faz-se a leitura das mesmas.

Caso não seja evidente qual o microrganismo que está presente no meio CPSE, estas colónias são repicadas para o meio MSA em caso de suspeita de *Staphylococcus* e de forma a obter a espécie de *Staphylococcus* que está presente no meio CPSE ou de *Candida* ou SGC2 em caso de suspeita de que seja um fungo.

No laboratório são usadas ansas de plástico de 10 µl, e as culturas são consideradas positivas em caso desta ter pelo menos 1000 Unidades Formadoras de Colónias (UFC) e caso a cultura não apresente vários tipos de colónias diferentes, sendo que se o meio apresentar 3 colónias diferentes é considerado uma contaminação ou uma flora mista.

A valorização do resultado da cultura deve ter em conta vários parâmetros, como a colheita da urina, que em caso de ter sido incorreta pode levar a uma obtenção de um resultado com mais de duas colónias presentes, sintomatologia do utente, observação do sedimento, sendo que se observar bacteriúria ou uma elevada quantidade de leucócitos por campo pode indicar uma cultura positiva e a presença de uma infeção urinária e os resultados de exames bacteriológicos anteriores ou histórico da pessoa. Em caso de ter sido valorizado o resultado da cultura da pessoa, devemos prosseguir a análise, realizando se necessários testes bioquímicos como o teste da oxidase, catalase ou indol, para diferenciar entre as diferentes espécies dentro do mesmo género e posteriormente fazer o antibiograma.

Dos microrganismos identificados no Laboratório Luísa Frazão a partir de amostras de urina, as mais comuns são a *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.* e algumas mais raras como a *Streptococcus agalactiae*.

As figuras 2,3,4,5,6 e 7 são fotografias tiradas no laboratório das espécies mais comuns que aparecem nas uroculturas e no meio preferencial para as uroculturas, o meio CPSE.

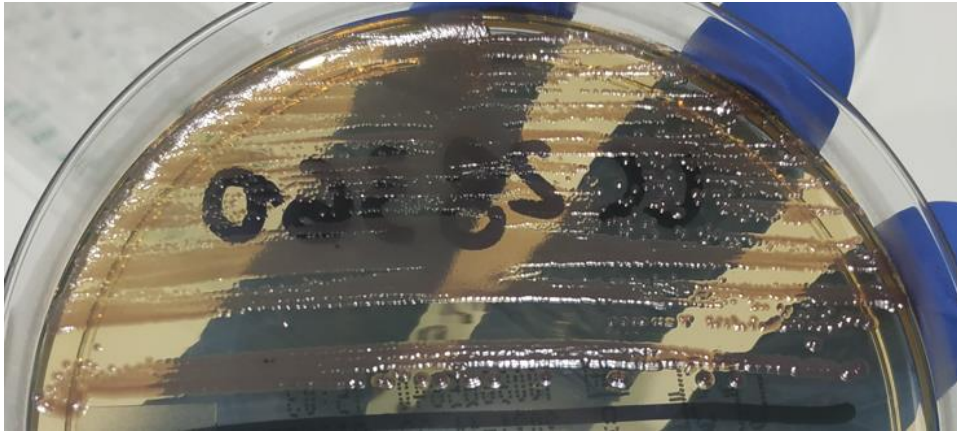


Figura 2- Colónias de *Proteus* spp. em meio CPS Elite.

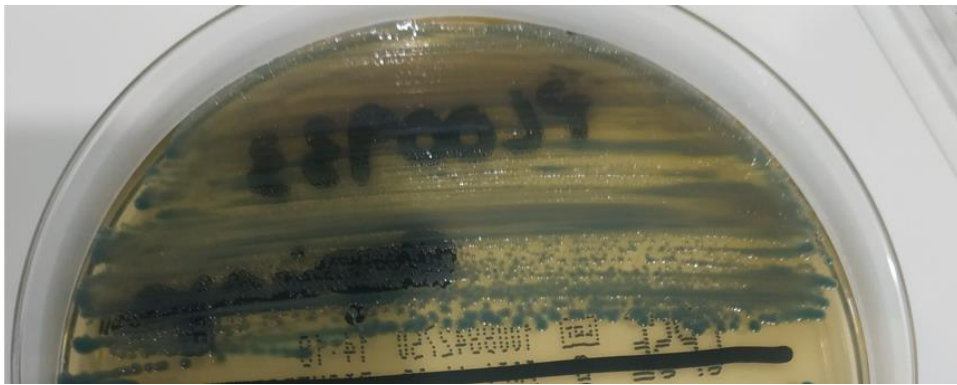


Figura 3- Colónias de *Klebsiella* spp. em meio CPS Elite.

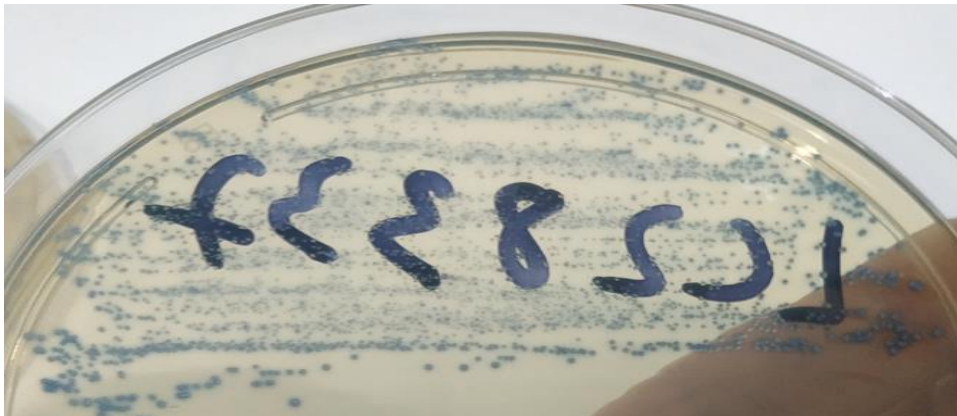


Figura 4- Colónias de *Streptococcus agalatae* em meio CPS Elite.



Figura 5- Colónias de *Pseudomonas* spp. em meio CPS Elite.



Figura 6- Colónias de *Enterococcus* spp. em meio CPS Elite.

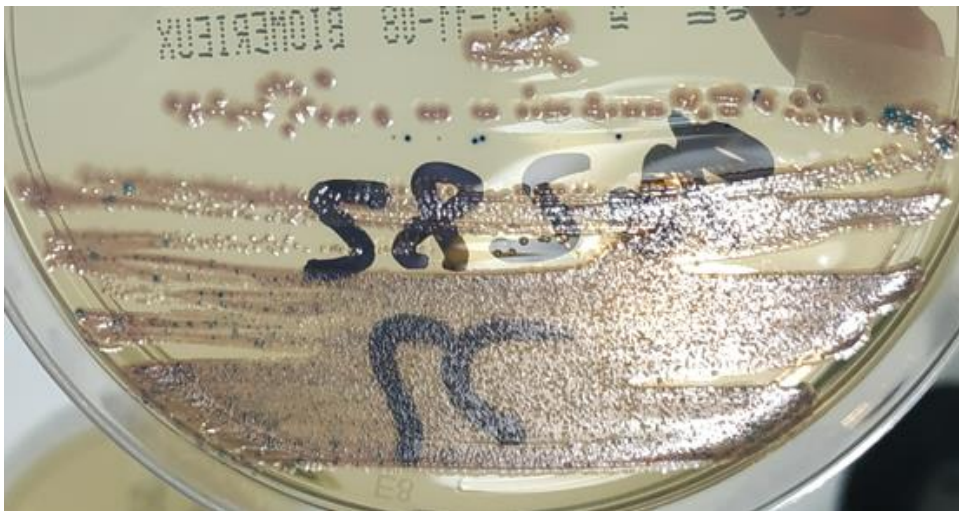


Figura 7-Colónias de *Escherichia coli* em meio CPS Elite.

5.2) Fezes

As fezes são o segundo produto que é mais comum no laboratório para fazer a sua cultura e identificação do microrganismo presente nessas mesmas fezes. Os organismos mais comuns para pesquisa na coprocultura são a *Salmonella spp.* e a *Shigella spp.*

Coprocultura

A colheita das fezes, por norma, deve ter três amostras de três dias consecutivos num recipiente estéril e sem refrigeração e sendo processadas assim que chegam ao laboratório essas mesmas amostras.

No caso da coprocultura, numa fase inicial as fezes das três amostras são inseridas num caldo de selenito que permite o enriquecimento das fezes e é incubado durante 12 a 16 horas. No final desse processo, o caldo é retirado e faz-se a subcultura nos meios sólidos, sendo que por norma os meios utilizados são os meios de Hektoen e SM2, que vão incubar posteriormente durante 24 horas.

Posteriormente, procede-se à observação das placas e características diferenciais dos meios de cultura sólidos Hektoen e SM2, e isso permite distinguir entre a *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. No meio de Hektoen as colónias de *Salmonella spp.*, aparecem com uma cor verde-azulada e com centro negro devido à formação de sulfeto de hidrogénio enquanto as colónias de *Shigella spp.*, apresentam apenas cor verde-azulada sem centro negro. No meio SM2 as colónias de *Salmonella spp.* aparecem com uma cor entre rosa e roxo enquanto as colónias de outras bactérias aparecem com cor distinta.

Exame Parasitológico de Fezes

O exame parasitológico de fezes é outro exame que é bastante pedido no laboratório Luísa Frazão, principalmente, em crianças. Este exame é feito com base no método de Ritchie, que será descrito na tabela III. Este exame parasitológico de fezes tem como objetivo permitir identificar a presença de parasitas nas fezes, sejam eles em forma de quisto, ovos ou mesmo larvas e conseqüentes doenças associadas aos diferentes parasitas.

Este método de Ritchie é um método utilizado por se tratar de um método rápido, eficiente e sensível, dependendo de centrifugações de formol e éter que vão permitir obter no sedimento das fezes os possíveis parasitas que estejam presentes nas mesmas. (10)

De seguida, ocorre a sua observação a fresco no microscópio ótico, na objetiva de 10x para encontrar possíveis ovos e para a visualização de quistos utiliza-se a objetiva de 40x.

Tabela III- Descrição do Método de Ritchie

Método de Ritchie
Medir cerca de 1 grama de fezes e inserir em tubo cónico
Juntar 10 ml de solução isotónica em cada tubo cónico e homogeneizar
Separar o sobrenadante do restante com um filtro
Centrifugar durante 1 minuto a 2000 rpm
Descartar o sobrenadante e repetir os passos anteriores até o sobrenadante se apresentar claro
Juntar 10 ml de Formolaldeído 4% , homogeneizar e aguardar 10 minutos
Juntar 5 ml de éter e homogeneizar durante 30 segundos
Centrifugar durante 2 minutos a 1500 rpm
Descartar sobrenadante e observar o sedimento

Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes

Este teste de pesquisa de sangue oculto também é um pedido regular, nomeadamente em pessoas acima dos 50 anos de idade. Trata-se de um teste imunocromatográfico que pesquisa de hemoglobina nas fezes, podendo ser feito através do teste da o-tolidina ou pelo teste imunológico que deteta especificamente a hemoglobina humana. As amostras vão reagir com anticorpos anti-hemoglobina humana e se houver a presença de teste positivo de pesquisa de sangue oculto quer dizer que há presença de hemoglobina nas fezes e o resultado é apresentado pelo teste imunocromatográfico com 2 bandas coloridas, uma na zona do teste e uma na zona controlo. Se for negativo apresenta apenas uma banda colorida na zona controlo.

Estes testes de pesquisa de sangue oculto são muito utilizados de forma a rastreio de possíveis cancros cólon-retais e servem muitas vezes de despiste em casos considerados de baixo risco, devido ao baixo custo do teste e a não ser um teste invasivo. (11)

5.3) Exsudados

Este tipo de amostras não é muito recorrente no laboratório Luísa Frazão, no entanto, ocasionalmente aparecem exsudados vaginais, exsudados orofaríngeos, exsudados purulentos ou exsudados ungueais. Por norma, são amostras que são recolhidas por profissionais de saúde por serem amostras mais complexas.

No caso dos exsudados vaginais são essencialmente para procura de *Streptococcus* de grupo B, nomeadamente, o *Streptococcus agalatae*, no entanto também pode ser para pesquisa de outros microrganismos.

Nestes casos dos exsudados as amostras são processadas assim que chegam ao laboratório e são semeadas nos diferentes meios no meio MSA, no meio MacConkey, no meio de Sabouraud, na gelose de Sangue e na gelose de PVX com atmosfera anaeróbia.

Esta atmosfera anaeróbia é conseguida através do GENbag que é constituído por uma bolsa de plástico e um gerador de atmosfera anaeróbia. Todos os meios são incubados a 37°C durante pelo menos 24 horas.

Juntamente com a cultura dos exsudados nos diferentes meios, pode ser feita a coloração de Gram que ajuda a identificar se a bactéria presente no exsudato é de Gram

negativa ou Gram positiva e com base nas suas características morfológicas e no tipo de agrupamento fazer uma identificação presuntiva do microrganismo presente na amostra.

Tudo isto é feito com o objetivo final de obter a identificação do microrganismo infeccioso e posteriormente à sua identificação, determinar a sua suscetibilidade e resistência aos diferentes antibióticos, de forma ao utente obter o melhor antibiótico possível para a sua infeção.

5.4) Exame Micológico (Dermatófitos)

No laboratório Luísa Frazão este tipo de exames é muito raro, no entanto, por vezes chegam amostras de raspados de pele ou exsudatos ungueais para pesquisa de dermatófitos.

Estas quando chegam são semeadas no meio de Sabouraud e no sistema Mycoline, efetuando também um exame direto ao microscópio na objetiva de 40x, de forma a pesquisar estruturas fúngicas típicas de dermatófitos.

Estes meios devem ser incubados a uma temperatura de 25°C por um período de um mês em caso de exame direto negativo, visto que há fungos de crescimento lento. No caso de crescerem fungos filamentosos, utilizando-se a técnica da fita cola, devem ser observadas as estruturas fúngicas reprodutoras ao microscópio com contraste azul de lactofenol.

As características microscópicas e macroscópicas do fungo devem ser consideradas e desta maneira facilitar a identificação do fungo em questão. Caso se obtenha crescimento de leveduras, as suas colónias devem ser isoladas no meio de *Candida* ID2 para identificar se se trata de *Candida albicans* ou de outra espécie de *Candida* ou então na gelose de Columbia para ser posteriormente identificada.

6) Identificação dos Microrganismos

Após a cultura ser feita e após conseguir uma cultura pura e o isolamento dos microrganismos, a fase seguinte passa pela identificação da espécie microbiana interveniente e pelo seu teste de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA), ou neste caso o antibiograma. Para isto fazemos a leitura das placas essencialmente das CPSE, das uroculturas, e que nos permite identificar as diferentes espécies que estão a provocar patologia, com base na visualização macroscópica e também com base em algumas provas bioquímicas.

O antibiograma é feito em diferentes galerias de ATB consoante a espécie envolvida, seja esta espécie o *Streptococcus*, uma enterobactéria, a *Pseudomonas* ou o *Staphylococcus*, que faz variar o antibiograma utilizado, e passado 24 horas a leitura é feita no Mini API, um aparelho que faz a leitura dos ATB com base na turbidez dos diferentes poços e que dessa maneira dá os resultados como resistentes ou susceptíveis para os diferentes antibióticos.

Todos os ATB seguem os padrões do EUCAST.

6.1) Provas Bioquímicas

- Teste do Indol

O teste de Indol é uma prova bioquímica que consiste na capacidade de um microrganismo em degradar o aminoácido triptofano e de produzir indol. Isto só ocorre em microrganismos que possuam uma enzima, a triptofanase. Isto permite que se faça a distinção entre diferentes microrganismos, uns capazes de degradar o triptofano e outros incapazes de o degradar. Um exemplo em que pode ser utilizado é para distinguir entre *Escherichia coli* e *Enterobacter spp.* ou *Klebsiella spp.*, mas também para distinguir entre espécies de *Proteus*, entre o *Proteus vulgaris*, negativo para o teste de Indol, e *Proteus mirabilis*, sendo este positivo para o teste de Indol. (12)

- Teste da Catalase

Este teste permite detetar a enzima catalase que degrada o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. Este teste é utilizado para diferenciar entre os organismos de Gram positivo. (13)

Há vários métodos para fazer o teste da catalase, no entanto o mais utilizado e o que se usa no laboratório Luísa Frazão é o método da lâmina. O método da lâmina consiste em colocar uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina e depois colocar em contacto com uma colónia isolada retirada com uma ansa. Caso se observe a formação de bolhas de oxigénio libertado pela reação química, estamos perante um teste positivo para a catalase. Caso não haja essa formação de bolhas de oxigénio, significa que o teste é negativo para catalase.

Esta prova é útil para diferenciar espécies de *Staphylococcus spp* de espécies de *Streptococcus spp*, sendo, respetivamente, catalase positiva e catalase negativa. (14)

- Teste da Oxidase

O teste de oxidase consiste em detetar a produção intracelular da enzima citocromo oxidase por maior parte das bactérias não fermentadoras (oxidase positiva), ao contrário das enterobactérias que não são produtoras desta enzima (oxidase negativa).

O reagente utilizado é o tetrametil-p-fenilenodiamina dihidroclorato, que funciona como um dador de eletrões para o citocromo c. Quando o tetrametil-p-fenilenodiamina dihidroclorato é oxidado pelo citocromo c, muda de cor para azul escuro ou roxo, sendo este dado como positivo para oxidase. Em caso de ser negativo este não muda de cor para roxo, porque não há oxidação pelo citocromo oxidase. (15)

- Teste de Hemólise

Este teste é especialmente importante nos *Streptococcus*, que são bactérias com capacidade de lisar os glóbulos vermelhos, podendo esta lise ser total ou parcial, e permitindo isto mesmo distinguir entre os diferentes grupos de *Streptococcus*.

Esta hemólise pode ser observada quando semeada em gelose de Columbia ou gelose de sangue, uma vez que a sua constituição contém glóbulos vermelhos.

A hemólise pode ser:

- β -Hemólise- hemólise total dos glóbulos vermelhos, formando um halo incolor à volta das colónias.
- α -Hemólise- ocorre hemólise parcial dos glóbulos vermelhos, formando um halo cinzento esverdeado ao redor das colónias.
- γ -Hemólise- não há hemólise.

7) Antibiograma

Com base nas características macroscópicas que conseguimos observar nos diferentes meios, e de acordo com a espécie identificada previamente, vai-se fazer a escolha do antibiograma, correspondente à espécie específica, de forma a fazer o seu teste de suscetibilidade a antimicrobianos, para percebermos a que antibióticos é que o microrganismo é resistente e suscetível, de forma, a ajudar o médico a administrar a melhor terapêutica possível ao paciente.

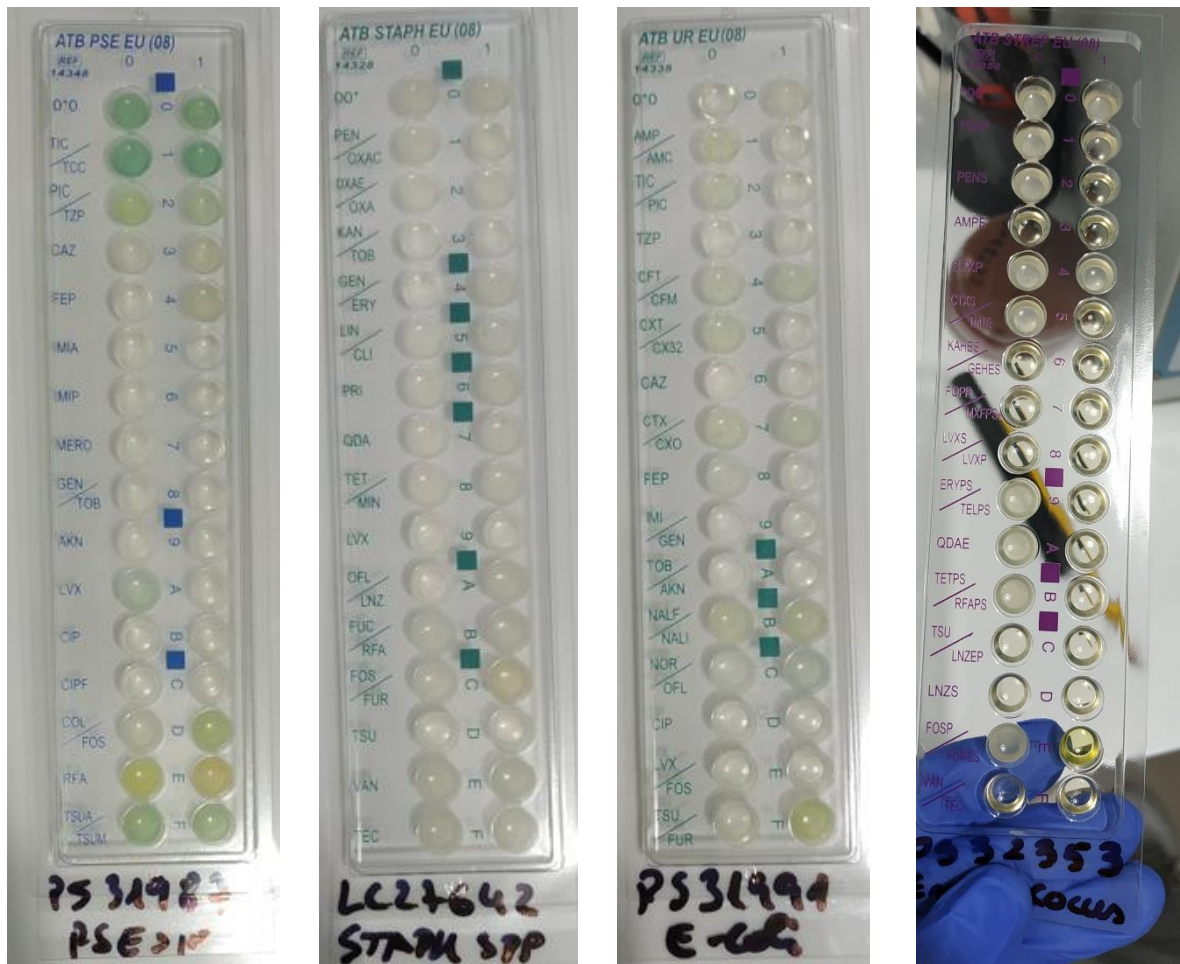
Para fazer isto, primeiro faz-se uma suspensão bacteriana com colónias da bactéria até, em caso geral, se obter uma turvação 0,5 McFarland, sendo esta, uma medida de turbidez padrão. Desta suspensão bacteriana vai-se transferir um volume conhecido seja 10 μ l ou 200 μ l, consoante o antibiograma que se quer fazer, para um meio de antibiograma. Depois de homogeneizar esse meio com a suspensão bacteriana que foi adicionada, transfere-se 135 μ l para cada poço do ATB que se está a fazer e perfaz-se os 32 poços com meio.

Após isso, deixa-se incubar os antibiogramas na estufa durante 24 horas e no dia seguinte faz-se a leitura no aparelho MiniApi (*BioMérieux*) que faz uma leitura com base na turbidez do meio, se o meio se apresentar turvo num poço, quer dizer que houve crescimento bacteriano com esse antibiótico e como tal há resistência, se o meio se apresentar sem qualquer turbidez quer dizer que o antibiótico é eficaz para combater esse microrganismo e, portanto, é suscetível para esse antibiótico.

Para cada microrganismo há um antibiograma diferente, sendo que no Laboratório Luísa Frazão, utilizamos o ATB (*BioMérieux*), que seguem as normas base da EUCAST. Este ATB contém cerca de 30 diferentes antibióticos específicos para cada espécie bacteriana.

As principais mudanças entre os diferentes ATB são o volume que se passa da suspensão bacteriana para o meio específico do ATB e a turvação de McFarland também varia com as diferentes espécies de bactérias.

Na Figura 8 serão expostos os diferentes ATBs utilizados no Laboratório Luísa Frazão.



A

B

C

D

Figura 8- Diferentes ATB (BioMérieux) após incubação: A- ATB PSE, que se utiliza no caso do microrganismo ser *Pseudomonas*; B- ATB STAPH- utilizado em *Staphylococcus*; C-ATB UR- utilizado em enterobactérias; D- ATB STREP- utilizado com *Streptococcus* ou *Enterococcus*;

8) SARS-COV 2

O SARS-COV 2 é um vírus que surgiu em Dezembro de 2019 e desde então propagou-se por todo o mundo gerando a pandemia mundial em que estamos envolvidos há cerca de 2 anos.

O SARS-COV 2 é um coronavírus RNA de cadeia simples, afeta tanto animais como humanos e afeta essencialmente a função respiratória dos humanos, levando a infeções respiratórias agudas, que levaram à morte de milhões de pessoas em todo o mundo.

No laboratório Luísa Frazão devido à situação que atravessamos, aprendi também a fazer colheitas para a SARS-COV 2, denominada correntemente, por Covid-19.

Para fazer as colheitas há uma série de cuidados que tive de ter para não meter em risco a minha saúde e a dos utentes que comigo fizeram o seu teste.

A primeira parte e a mais importante é a utilização de máscara e viseira, de forma a tornar a entrada do vírus no nosso organismo praticamente impossível, visto que este vírus entra pelas vias respiratórias e se liga a células específicas na nasofaringe, zona onde se faz a colheita. A segunda parte é utilizar um fato impermeável, de forma ao vírus ficar contido no fato e não contaminar a roupa que usamos em casa. A terceira parte é a utilização de luvas quando se faz o teste e a sua posterior desinfeção, assim como, a desinfeção das superfícies todas entre cada utente, de forma às superfícies estarem desinfetadas e não haver possibilidade do utente seguinte se contaminar.

A colheita, deve ser feita de forma a que a zaragatoa atinja a zona da nasofaringe de forma a obter a melhor amostra possível e ao introduzir a zaragatoa esta deve ser introduzida rodando a zaragatoa durante 10 a 15 segundos e após a remoção da zaragatoa deve ser colocada num tampão, no caso do laboratório Luísa Frazão é utilizado tampão fosfato-salino, denominado, correntemente como PBS.

O RT-PCR, teste de análise às amostras de zaragatoa Covid-19, não aprendi a fazer no laboratório Luísa Frazão apesar desse teste ser feito no laboratório.

Imunologia

A área da imunologia no laboratório Luísa Frazão é composta essencialmente por três equipamentos, o Beckman Coulter Dxl 600, o Immunocap 100 e o Vidas. Neste setor são usadas essencialmente variados tipos de imunoensaios nos doseamentos de marcadores tumorais, hormonas e de anticorpos.

O Beckman Coulter Dxl 600 é responsável por fazer os doseamentos de hormonas e alguns marcadores tumorais, o Immunocap 100 utilizado essencialmente para o doseamento de ANAs , alergias ou mesmo para autoanticorpos e o Vidas é responsável pelo doseamento de marcadores tumorais e outros parâmetros como hormonas ou anticorpos para doenças virais.

1)Receção e Tratamento de Amostras

As amostras recolhidas para este setor são na sua maioria amostras de sangue e essencialmente amostras de soro, no entanto também podem surgir amostras de urina pontual, urina de 24 horas com ou sem ácido ou amostras de plasma EDTA ou Heparina. No entanto, no laboratório Luísa Frazão, trabalhamos essencialmente com amostras de soro.

Estas amostras são, por norma, colhidas para um tubo que não contém anticoagulante, apenas contém um gel separador e micropartículas de sílica ativadoras da coagulação. O soro é posteriormente obtido após acontecer a retração do coágulo e é em seguida sujeito a centrifugação a 4000 rpm (rotações por minuto) durante cerca de 9 minutos.

2)Imunoensaios

As hormonas e os marcadores tumorais são quantificados através de métodos imunoquímicos. Estes métodos têm como principal base uma reação entre um antigénio específico e um anticorpo específico.

Há vários tipos de imunoensaios e irei descrever alguns deles, principalmente, os que são utilizados pelos equipamentos do laboratório, sendo eles o teste imunoenzimático por fluorescência (ELFA) utilizado pelo aparelho Vidas, o imunoensaio por quimioluminescência (CLIA) usado pelo Beckman Coulter Unicel Dxl 600 e o imunoensaio fluoroenzimático utilizado pelo ImmunoCap 100.

2.1) Princípios dos Imunoensaios

- Imunoensaios competitivos

Este imunoensaio consiste numa competição entre dois antígenios distintos, um antígeno marcado e outro antígeno não marcado. Estes antígenios vão competir entre si para se ligarem a uma quantidade finita de anticorpo que se encontra fixa numa matriz sólida.(16)

Desta maneira, é adicionada uma quantidade conhecida de antígenios marcados juntamente com o antígeno da amostra (não marcado), à matriz com os anticorpos. De seguida e após a incubação e lavagem vai-se determinar o sinal emitido pelas ligações entre os antígenios e os anticorpos. O sinal é inversamente proporcional à concentração de analito na amostra, uma vez que quanto mais antígenios da amostra (não marcados) se ligarem aos anticorpos, menos antígenios marcados se vão conseguir ligar aos anticorpos. (17)

Desta maneira, ao fazer a leitura da fluorescência, tem de se ter em especial atenção que as concentrações de fluorescência obtidas são concentrações inversas das concentrações reais e correspondentes à amostra do utente.

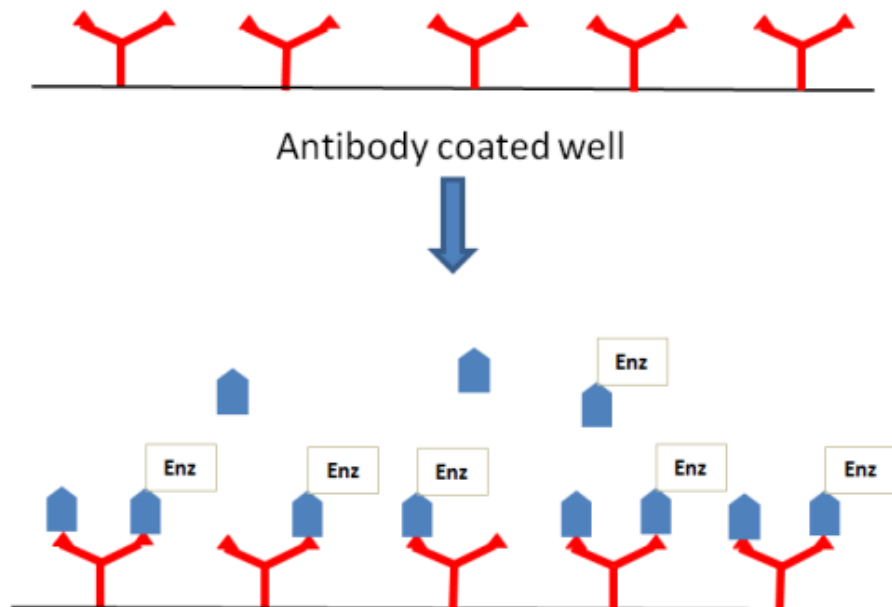


Figura 9- Esquema de Imunoensaio competitivo. (17)

- Imunoensaios não competitivos (Sandwich)

Neste tipo de imunoensaios temos a presença de dois tipos de anticorpo, estando um deles fixo numa matriz sólida, o anticorpo que captura o antígeno e é mais específico para o mesmo, e o outro anticorpo, denominado, anticorpo de detecção de antígeno que se liga num epítopo diferente do antígeno ligado ao anticorpo de captura.

O antígeno liga-se primariamente ao anticorpo de captura e após lavagem dos antígenos livres (não-ligados) é adicionado um segundo anticorpo, o anticorpo de detecção, um anticorpo marcado, que se vai ligar a um local de ligação (epítopo) diferente no antígeno, formando-se após esta ligação um complexo antígeno-anticorpo e, portanto, sendo este o fenómeno descrito como “sandwich”, devido ao antígeno se encontrar entre os dois anticorpos.

Sendo assim, quanto mais antígeno se ligar ao anticorpo de captura, mais anticorpos marcados se vão ligar aos antígenos, logo o sinal que se vai obter vai ser quanto maior quanto maior o número de ligações de antígeno-anticorpo que ocorrem, logo o sinal de detecção de anticorpos marcados é diretamente proporcional à concentração de antígeno que se encontra na amostra. (17)

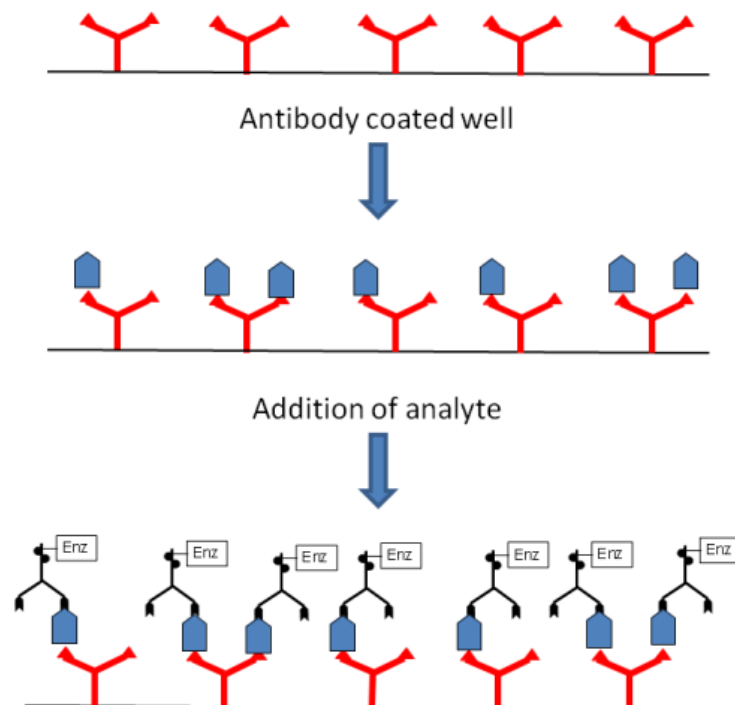


Figura 10- Esquema de imunoensaios não competitivos (Sandwich). (17)

2.2) Métodos de Detecção de Imunocomplexos

- Chemiluminescent immunoassay (CLIA)

A quimioluminescência é a técnica utilizada pelo Unicel Dxi 600, para executar alguns imunoensaios e para detetar alguns parâmetros importantes no diagnóstico clínico.

A quimioluminescência é um método que permite a deteção de concentração das amostras tendo por base a sua intensidade de luminescência e usa como base ensaios competitivos ou não competitivos.

No geral, a quimioluminescência é definida como a produção de radiação eletromagnética observada quando há uma reação química em que ocorre a excitação eletrónica e formação de um produto ou um intermediário. Este produto ou intermediário, vai posteriormente emitir luminescência ou transferir a energia para outra molécula, que vai emitir luz. (18)

Os imunoensaios de quimioluminiscência indiretos, os imunocomplexos antígeno-anticorpo têm acoplados um anticorpo marcado, sendo este, por exemplo a fosfatase alcalina ou a peroxidase de rábano, que vão reagir com substratos cromogénicos, levando-os a emitir fluorescência que é de seguida fotomultiplicada e quantificada.

Recentemente, a quimioluminescência tem obtido uma especial atenção em diferentes campos, passando pelas ciências da vida, análises farmacológicas e diagnóstico clínico, tudo isto devido à sua alta sensibilidade, boa especificidade e ao elevado tipo de aplicações que tem.

Este sistema de análise permite obter um alto rendimento e reduzir o tempo de análise e custos de reagentes e outros afins do laboratório. (19)

- Enzyme-Linked Fluorescent Assay(ELFA)

O princípio de ELFA é o princípio utilizado pelo Vidas. O aparelho Vidas é um sistema de imunodiagnóstico que executa ensaios imunológicos. O analisador utiliza o princípio de ELFA (Ensaio Fluorescente ligado à enzima) que é um princípio que se adapta a uma grande diversidade de ensaios combinando um imunoensaio enzimático com duas etapas, com base no método não competitivo (sandwich), e uma leitura final por fluorescência. (20)

A enzima utilizada por este princípio de ELFA é a fosfatase alcalina e o substrato é 4-Metil-Umberiferil fosfato (4-MUP) hidrolisado em 4-metil-umbeliferona, que vai gerar fluorescência aos 450 nm, após excitação aos 350 nm. (21)

Esta técnica permite a detecção de uma série de parâmetros, desde marcadores tumorais, como os CA, CEA, AFP, como também, marcadores de infecções primárias recentes, especialmente em grávidas, tais como IgM anti-CMV ou IgG anti-CMV ou marcadores de infecções virais diversas, como a IgM anti-HAV ou IgG anti-HAV (hepatite A).

- Fluoroenzyme Immunoassay (FEIA)

Este método é utilizado pelo ImmunoCap 100, equipamento utilizado para a determinação de diversos parâmetros, tais como, IgE ou IgG para diversos tipos de alergias e auto-anticorpos.

O imunoensaio fluoroenzimático é um imunoensaio para a determinação de anticorpos específicos de antígeno em que a reação enzimática é revelada pela formação de um produto fluorescente. Neste caso, quanto maior for a intensidade de fluorescência da reação enzimática, maior a concentração de anticorpos específicos presentes na amostra. (22)

O imunoensaio fluoroenzimático tem como base o método não competitivo, em que há um alérgeno fixo numa matriz sólida e ao qual se liga um anticorpo específico, por exemplo, no caso de uma IgE específica. A IgE específica, caso esteja presente na amostra, vai então ligar-se ao alérgeno. Em seguida, vai haver uma lavagem para eliminar os anticorpos não ligados. Após esta lavagem, haverá então a adição de um segundo anticorpo específico para o anticorpo ligado ao antígeno, e que se encontra marcado, levando à formação do complexo antígeno-anticorpo.

Após incubação, o conjugado não ligado é lavado e o conjugado ligado é incubado com solução de desenvolvimento. Quando a reação pára, procede-se à leitura da fluorescência.

3-Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros fluidos biológicos e que, em caso de aparecimento ou alteração da sua concentração, pode levar a suspeitar que se trata de um aparecimento ou crescimento de células cancerígenas ou neoplásicas.

Estes marcadores podem ser proteínas, antigénios de superfície celular, enzimas ou hormonas, que indicam em caso de alteração das suas concentrações a presença de um cancro.

No entanto, estes marcadores podem, por vezes, estar ligeiramente aumentados e não estarem a ser produzidos por células neoplásicas, mas sim por células normais, daí haver valores de referência para cada um dos diferentes marcadores tumorais, de forma a perceber-se se o aumento é muito elevado ou se está elevado mas dentro dos valores de referência. (23)

Os marcadores tumorais têm cinco potenciais utilidades no tratamento do paciente, sejam elas o diagnóstico, a monitorização da terapêutica, estabelecimento de prognóstico, observação de possíveis recidivas e a fase inicial de triagem. (24)

O valor do marcador tumoral é dado consoante o seu grau de especificidade e de sensibilidade. Dado isso, quase todos os marcadores com a exceção da PSA, não são marcadores ideais para o diagnóstico dos respetivos tumores nos mais diversos órgãos. (24)

O marcador ideal seria um marcador com todas as características descritas acima, ou seja, com capacidade e utilidade tanto para o diagnóstico, monitorização de terapêutica, estabelecimento de prognósticos ou deteção precoce de recidivas. Além disso, deve ainda ser específico para um determinado órgão, assim como ser um marcador altamente sensível que evitaria por completo a presença de falsos positivos.

Estes marcadores por vezes podem-se encontrar muito aumentados em tumores benignos em fases iniciais, e não se encontrarem praticamente aumentados em tumores malignos, numa fase precoce. (24)

Devido a essa falta de especificidade dos diversos marcadores, estes não devem ser utilizados como método de triagem e diagnóstico de tumores, mas sim como forma de monitorizar terapêuticas.

As determinações destes marcadores tumorais, no laboratório Luísa Frazão, são realizadas essencialmente em amostras de sangue, mais concretamente no soro, sendo desta forma um processo pouco invasivo, mais barato e mais rápido.

Na tabela IV, serão apresentados os equipamentos e os marcadores tumorais analisados em cada um dos equipamentos, no laboratório Luísa Frazão.

TABELA IV- Equipamento e marcadores analisados pelo equipamento

Equipamento	Marcadores
Unicel Dxl 600	PSA livre PSA Total
Vidas Biomérieux	CEA AFP CA 19.9 CA 12.5 CA 15.3 HCG

- Alfa-Fetoproteína (AFP)

A AFP é uma glicoproteína, semelhante à albumina, sintetizada normalmente durante o desenvolvimento embrionário, tanto pelo fígado como pelo saco vitelínico. Após o nascimento, a concentração desta glicoproteína, diminui rapidamente até atingir valores praticamente nulos. (25)

A avaliação dos níveis séricos da AFP tem valor clínico para auxiliar no diagnóstico e monitorização de uma série de patologias, sendo que as principais são o carcinoma hepatocelular primário e o tumor testicular.

Esta avaliação é importante no caso do carcinoma hepatocelular primário, visto que valores acima de 60% dos casos em que um indivíduo apresenta níveis séricos superiores a 500 ng/ml, este possui carcinoma hepatocelular. No caso do tumor testicular, os valores séricos de AFP estão também aumentados em 75% das vezes e deve ser avaliado juntamente com a concentração sérica da β -HCG, visto que ambas sofrem um aumento no caso do tumor testicular.

O aumento da AFP pode também estar relacionada com a regeneração de tecido hepático, associado a hepatite viral, cirrose hepática ou a necrose de células hepáticas provocada por medicamentos. (26)

O valor de referência da alfa-proteína é de < 5 UI/ml.

- CA 125

O CA 125 é um antígeno constituído por uma glicoproteína de elevado peso molecular e que é reconhecido quando estamos na presença de cancro do ovário ou outras doenças patológicas associadas aos tecidos que têm como origem os ductos de Müller.

Os valores de referência do CA 125 em indivíduos normais, são abaixo de 35 U/ml e em caso de serem superiores a este valor podem estar associados a patologias.

Apesar de poder ser associado a outras patologias que não o cancro do ovário e apesar das suas limitações tanto ao nível de especificidade como sensibilidade, o CA 125 possui valor clínico a nível de diagnóstico e monitorização do cancro do ovário e como indicador de prognóstico do cancro e de avaliação de possíveis reincidências.

Este parâmetro aumenta a sua sensibilidade para o cancro do ovário conforme a sua evolução. No estadio I apresenta uma sensibilidade de 50% e nos estadios II a IV aumenta a sua sensibilidade para valores superiores aos 90%. (27)

- CA 15.3

O CA 15.3 é uma glicoproteína mucínica de elevado peso molecular, utilizada essencialmente como marcador tumoral do cancro da mama. (28)

Este marcador é um antígeno associado a tumor detetado através de dois anticorpos monoclonais o DF-3 e o I I5 D8. O primeiro anticorpo monoclonal foi descrito como tendo sido associado a metástases de cancro da mama no fígado, e o segundo anticorpo monoclonal foi obtido usando uma membrana da globina da gordura do leite materno, respetivamente. (29)

É essencialmente utilizado como marcador de cancro da mama, sendo no entanto, também possível de encontrar em outras patologias, sendo elas alguns tumores, tais como, tumores ováricos, pulmonar e hepatocarcinomas.

É um marcador que não deve ser utilizado como marcador de diagnóstico de cancro da mama, visto que não é suficientemente sensível para a execução de diagnóstico, no entanto é altamente sensível e específico para a deteção precoce de recidivas e prognóstico da patologia.

Os valores de referência são $< 30\text{U/ml}$.

- CA 19.9

O CA 19.9 é um marcador tumoral para muitos tumores colorrectal. Este CA 19.9 foi descrito como sendo um hidrato de carbono, um oligossacarídeo relacionado com o grupo de Lewis. (30)

O CA 19.9 é por norma utilizado para detetar tumores colorrectais, no entanto, também se podem encontrar valores elevados de CA 19.9 em caso de pancreatites, cancros do pâncreas, e outros tipos de patologias.

Os valores de referência de CA 19.9, são valores abaixo de 37 U/ml , sendo considerado este valor como um valor normal. Valores acima deste, podem ser considerados como valores de potencial patologia. (30)

Este marcador não é útil, como marcador de diagnóstico de cancro, visto que só tem uma sensibilidade mais elevada em estadios do cancro mais avançados, no entanto pode servir

como marcador para avaliar estadios do cancro e para monitorizar a progressão da doença durante a terapêutica. (23)

- Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

O CEA é uma glicoproteína envolvida na adesão celular, e normalmente é produzida durante o desenvolvimento fetal, mas a sua produção termina antes do nascimento.

Este marcador tumoral é utilizado para deteção de casos de cancro colorrectal, ou também para cancro de pulmão.

Em alguns estudos, foi detetada uma elevada concentração de CEA e foi dado como útil a utilização deste marcador tumoral, principalmente em ocasiões de diagnóstico precoce de uma recidiva, em casos de monitorização de terapêutica ou mesmo para avaliar a progressão da patologia. (31)

Este marcador tumoral não é específico para diagnóstico de cancro, devido a aparecer elevado em algumas patologias não cancerígenas, tais como, cirrose alcoólica, doença de Crohn e outras patologias benignas. (23)

Os valores de referência neste marcador variam entre 3,5 e 7 ng/ml.

- hCG

A hCG é uma hormona glicoproteica produzida em concentrações muito elevadas pelos trofoblastos placentários. Por norma, utilizado essencialmente para confirmar possível gravidez e semanas de gestação com base na concentração de hCG, e também pode ser utilizado como marcador tumoral.

A sua concentração no soro, aumenta nas primeiras semanas da gravidez atingindo o seu pico entre as 7 e as 10 semanas, dado que a sua função é controlar a secreção da progesterona e o corpo lúteo, durante as primeiras semanas de gestação.

Esta hormona tem duas subunidades, a subunidade α , que é a mais comum entre as diferentes hormonas, e a subunidade β , esta que é utilizada especificamente para diagnóstico de tumores não trofoblásticos. (32)

A concentração de hCG, no soro, por norma pode encontrar-se aumentada em casos de tumores trofoblásticos e em neoplasias nos ovários e nos testículos. Quando o tempo de semi-vida da hCG é maior que 3 dias e meio, pode ser indicação de ocorrência de uma recidiva ou apenas de prognóstico adverso, o que pode indiciar a necessidade da toma de uma terapêutica mais agressiva, sendo por isso este marcador um bom marcador de monitorização da terapêutica.

Este marcador da hCG está por vezes associado a outros marcadores, tais como, a LDH e a AFP, sendo que quando estes são medidos e se encontram em elevadas concentrações no soro, pode ser um prognóstico de doença associada a tumores germinativos do testículo.

A hCG, mais especificamente, a β hCG pode ser também detetada em tumores não trofoblásticos, tais como, cancro na bexiga, na mama, no rim, na glândula pituitária, e ainda outros tecidos. (32)

Os valores de referência da hCG é de <5 U/L.

- Antígeno específico da Próstata (PSA)

Este antígeno específico da próstata, como o próprio nome indica, é um marcador tumoral utilizado no diagnóstico do cancro da próstata. A PSA tem um papel importante no diagnóstico precoce do cancro da próstata, sendo importante para a redução da mortalidade. (33)

A PSA é uma serino-protease com baixa atividade enzimática e expressa-se essencialmente na glândula prostática e é responsável pela proteólise de algumas proteínas que constituem o sémen.

A PSA pode estar presente em várias formas enzimáticas, inicialmente existe o precursor da PSA, a proPSA que é inativado no líquido seminal e forma a PSA livre. Em condições normais, são detetadas baixas concentrações de PSA no soro.

No entanto, elevadas concentrações de PSA, pode ser indicativo de cancro ou, pode estar associado a variadas causas, sendo elas, a hiperplasia benigna da próstata ou outro género de infeção. (34)

Devido a estes fatores, a PSA não serve como método de diagnóstico, visto que não tem especificidade suficiente para ser um marcador de diagnóstico, mas é um bom biomarcador de progressão ou regressão da doença, ou biomarcador de recidiva após a terapêutica. O aumento sérico pode ser utilizado também como indicador de estadió da doença.

Para diminuir o número de falsos positivos de cancro da próstata, faz-se a percentagem entre a PSA livre e a PSA total, visto que a PSA livre está mais associada a doenças benignas, tal como, a hiperplasia benigna da próstata. Isto é feito, nas concentrações entre os 2,5 e os 10 ng/ml, sendo que uma relação mais baixa pode ser maior indicativo de cancro e uma relação entre a PSA livre e a PSA total, mais elevada, pode ser indicativo de doenças benignas. (34; 35)

O valor de referência da PSA é <4ng/ml.

4- ImmunoCap 100 (Auto-Imunidade e Alergias)

O Laboratório Luísa Frazão está equipado com um ImmunoCap 100, como já tinha sido referido anteriormente. Este ImmunoCap 100 utiliza, essencialmente, a técnica FEIA, descrita anteriormente e é utilizado para a execução dos testes de alergias e de auto-imunidade.

4.1) Auto-Imunidade

A doença auto-imune pode ser descrita como uma desregulação ou disfunção no sistema imunitário, no qual essa mesma disfunção leva à ativação do sistema imunológico e da resposta imunológica contra auto-antígenos celulares ou contra células específicas de alguns órgãos.

Esta autoimunidade tem vários estadios, uns de progressão e outros de regressão da própria doença. (36)

No caso do ImmunoCap 100, este vai avaliar alguns anticorpos, tais como, o anti-dsDNA, os ANAs e a Imunoglobulina E específica para as alergias.

- Anticorpos anti-dsDNA

Os anticorpos anti-dsDNA são um dos parâmetros determinados pelo ImmunoCap 100, e são anticorpos específicos do Lúpus eritematoso sistémico. Este Lúpus eritematoso sistémico (LES) é uma doença auto-imune, na qual ocorre destruição do tecido conjuntivo.

Elevadas concentrações de anticorpos IgG anti-dsDNA estão, por norma, associados à atividade da doença e seu estadió tendo um papel importante na deteção de nefrite luposa, que é uma inflamação do rim causada pelo LES. (37)

- ANAs

Anticorpos antinucleares (ANAs) foram descobertos no soro de pacientes com LES, no entanto, também foram associados a outro tipo de patologias auto-imunes.

Estes anticorpos foram reconhecidos por reagir com antigénios não específicos no núcleo das células humanas.

O método mais comum para analisar os ANAs é o método da fluorescência indireta, que é um dos métodos que são executados pelo ImmunoCap 100. Por norma, este teste é feito incubando soro do paciente num substrato de antigénio celular, por norma clones de células cancerígenas devido a serem, por norma, células imaturas e terem núcleos maiores. Após a incubação e a lavagem, para se detetar os anticorpos do paciente ligados aos antigénios nucleares é adicionado o composto fluorescente marcado contra anticorpos anti-Imunoglobulina G. (38)

- Imunoglobulina E (IgE)

A IgE é a imunoglobulina geralmente associada a doenças alérgicas. A identificação das substâncias que provocam estes sintomas alérgicos é muito importante para os utentes terem uma melhor qualidade de vida.

Alergia é uma reação de hipersensibilidade por ação de mecanismos imunológicos. A alergia pode ser mediada por anticorpos ou por células. Por norma o anticorpo responsável pela reação alérgica é a IgE. (39)

Hipersensibilidade é uma reação imunológica exagerada ao contacto com alérgenos não próprios. Há vários tipos de hipersensibilidade, variando de I a IV. O tipo I é o tipo de hipersensibilidade que envolve a IgE. A reação que ocorre no tipo I é por ativação de mastócitos, células que contêm na sua superfície recetores específicos para IgE que posteriormente se ligam a esses mesmos recetores. As IgE ligadas na superfície vão-se ligar ao alérgeno ativado. Esta reação de tipo I está associada a situações de renite alérgica e asma.

No laboratório Luísa Frazão, apesar de não ser comum, são feitas análises de várias alergias, como por exemplo, comida, pólen de plantas ou mesmo a pelo de gato. Todas estas análises às mais diversas alergias são feitas com o soro do utente.

4.2) Imunocromatografia

A imunocromatografia é um conceito que combina a cromatografia, que separa componentes de uma amostra com base nas diferenças no seu movimento sob um solvente, com reações imunoquímicas.

Atualmente, o sistema imunocromatográfico mais utilizado é o teste de tira, um conjunto de transportadores porosos impregnados com imunoreagentes. Em contacto com a tira de teste estará a amostra líquida, seja ela soro, plasma, sangue, urina ou outro tipo de amostra biológica envolvida em algum tipo de tampão, que vai fluir através dos transportadores e vai haver a formação de imunocomplexos em zonas específicas da tira, na zona de controlo e na zona de teste.

Este tipo de testes são muito utilizados para testes de gravidez, a drogas e paramarcadores de algumas doenças. (40)

Nos últimos anos, o termo imunocromatografia tem sido utilizado para outro tipo de análises, separação de amostras numa coluna contendo um solvente com anticorpos específicos ligados covalentemente para uma substância alvo. Apesar de serem análises diferentes, ambas têm o mesmo fundamento geral.

No laboratório Luísa Frazão utiliza-se também uma série de testes imunocromatográficos, tais como, o teste precoce da hCG (teste de gravidez), de mononucleose infecciosa (Paul-Bunnell), canabinóides na urina, sangue oculto nas fezes e testes de antígeno à Covid-19, mais recentemente.

Os testes imunocromatográficos são testes rápidos e que permitem a rápida formação de imunocomplexos e permitem resultados com alguma sensibilidade que permitem diagnósticos rápidos para uma série de parâmetros.

4.3) Testes de Aglutinação

Os testes de aglutinação são essencialmente testes rápidos, feitos com técnicas manuais, e que permitem detetar de forma semi-quantitativa a presença de anticorpos ou antigénios.

No laboratório Luísa Frazão são feitos alguns testes de aglutinação, tais como, o RPR carbon, o teste da antiglobulina direta e indireta (teste de coombs) e o teste de artrite reumatóide (teste RA).

- Rapid Plasma Reagin (RPR carbon)

O teste de RPR (Rapid Plasma Reagin) é um teste de aglutinação utilizado nos perfis de grávida e como medida de diagnóstico de suspeita de sífilis. Este é um teste de floculação não treponemal que utiliza o antigénio cardiolipina com partículas de carvão para detetar *Reagin*. A *Reagin* vai-se ligar com a partículas de cardiolipina-lecitina-colesterol, que causam a floculação. Este teste faz uma determinação qualitativa e semi-quantitativa da presença de anticorpos de sífilis. (41)

- Teste Artrite Reumatóide (RA test)

A artrite reumatoide é uma doença auto-imune que afeta uma pequena percentagem da população humana. É uma doença que quanto mais cedo for detetada menor será a probabilidade do paciente ter danos irreversíveis. Esta deteção precoce previne a chegada da doença a estadios mais avançados. O teste para a artrite reumatoide é com base no fator reumatoide, que é um autoanticorpo que tem como alvo uma região da IgG , sendo este determinado a partir de um teste de aglutinação envolvendo o soro do paciente e partículas de latex. (42)

Se o resultado for positivo e se obtiver aglutinação, são feitas diluições para obter a relação correta de anticorpos presentes.

- Teste de Coombs

O teste da antiglobulina pode ser um teste direto ou indireto e é por norma denominado por teste de Coombs.

O teste de Antiglobulina direto (TAD) é utilizado essencialmente para determinar se os glóbulos vermelhos têm Imunoglobulinas G (IgG) ligadas na sua superfície. No laboratório Luísa Frazão o TAD é feito com base no método do gel na microcoluna em que os eritrócitos são inseridos na matriz misturada com reagentes de antiglobulina humana e o gel vai fixar os eritrócitos que aglutinam, os restantes passam pela coluna e ficam fixados no fundo da coluna. (43)

O teste da Antiglobulina indireta (TAI) é feito com o soro do utente em contacto com três tipos de células sanguíneas já preparadas e após incubação e centrifugação vai-se verificar se houve aglutinação. Em caso de haver aglutinação quer dizer que o utente tem anticorpos contra os eritrócitos e que não se deve proceder a transfusão sanguínea. (44)

Este é um teste muito requisitado para grávidas Rhesus negativo, para se verificar se a grávida produziu anticorpos anti-D por ação dos eritrócitos do feto. No caso de ser positivo, aumenta a possibilidade de haver lise dos eritrócitos do recém-nascido.

5- Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade no setor da imunologia é feito através de um controlo interno, que consiste num controlo de qualidade multiparamétrico que determina os diversos desvios-padrão para os variados testes e avaliando diariamente tanto os reagentes como as calibrações dos reagentes, principalmente no caso do Beckman Coulter Unicel Dxl 600.

Há também o controlo externo para o Unicel Dxl 600, que é um controlo da *Randox Internacional Quality Assessment Scheme (RIQAS)* que é realizado periodicamente.

O controlo de qualidade do VIDAS é essencialmente o controlo de qualidade externo do RIQAS em que são avaliados todos os parâmetros e os resultados são enviados a ver se estão de acordo com aquilo que é determinado.

Bioquímica Clínica

A bioquímica clínica é um dos principais setores dentro de um laboratório de análises clínicas, sendo que é especialmente importante porque nos permite avaliar todas as funções do organismo e o seu funcionamento. Isto é possível devido ao elevado número de parâmetros que se consegue avaliar.

Neste setor, são avaliados diferentes parâmetros e diferentes tipos de amostra, desde soro a urina de 24 horas ou urina amostra, para determinação de albumina de baixa concentração, seja nas 24 horas ou na amostra.

Os parâmetros mais comuns que se determinam no soro dos utentes são o colesterol total, o colesterol LDL, o colesterol HDL, os triglicéridos, a glicose, a creatinina, o ionograma e algumas enzimas, tais como, as transaminases, AST e ALT, a fosfatase alcalina e a gamaglutamiltranspeptidase (gama-GT).

Estes parâmetros são muito úteis, tanto para monitorizar terapêuticas, como para auxiliar ao diagnóstico de algumas patologias.

Este setor é o setor mais automatizado, visto que o equipamento faz todas as determinações sendo apenas necessário introduzir as amostras no equipamento, e o setor é constituído essencialmente pelo Beckman Coulter Au-480 que faz todas as determinações bioquímicas através de técnicas fotométricas.

Hematologia

No setor da Hematologia são realizadas variadas determinações, passando pelo hemograma com fórmula leucocitária, pela determinação da velocidade de sedimentação, pelas provas de coagulação e respetivos fatores, até à parte mais manual que envolve essencialmente a execução de esfregaços sanguíneos e conseqüente visualização ao microscópio ótico.

Estes esfregaços podem ser feitos em caso de dúvida numa determinada contagem pela parte do equipamento, ou para confirmação de alguma patologia. Podem-se fazer esfregaços para avaliar diferentes tipos de células sanguíneas, alguns esfregaços para células mais imaturas, como reticulócitos, que envolvem um tipo de corante e outros esfregaços para células sanguíneas em que os corantes utilizados são diferentes.

Este setor é importante para avaliar o estado do indivíduo e para determinar algumas patologias, tais como, anemias ou leucemias, em caso de suspeita por parte do médico.

Neste setor, englobamos também a determinação da hemoglobina glicada, muito pedida pelos médicos, nomeadamente para monitorizar pessoas com diabetes.

Por norma, é um setor em que a validação dos resultados não é demorada.

Conclusões

O estágio teve a duração de 6 meses e determinou o finalizar de 6 anos de estudos e 2 anos no Mestrado em Análises Clínicas.

Foi um estágio que me deu noções muito importantes daquilo que é trabalhar e me preparou para o mundo de trabalho da melhor forma. No estágio aprendi a trabalhar com os mais diversos equipamentos, a forma de estar num laboratório e permitiu-me pôr em prática as diversas componentes que aprendi durante estes dois anos no Mestrado em Análises Clínicas.

Foi-me permitido aprender a fazer a manutenção de alguns equipamentos do laboratório, a interpretar controlos e a fazer calibrações dos equipamentos.

Durante todo o estágio, todos os funcionários do laboratório se mostraram disponíveis a explicar-me todas as dúvidas que me iam surgindo durante o percurso.

Durante este estágio foi-me permitido também aprender a fazer colheitas de sangue e colheitas Covid-19, ambas fundamentais para trabalhar neste meio.

Foram 6 meses muito importantes no meu desenvolvimento pessoal e profissional em que obtive conhecimentos chave para desempenhar o meu trabalho da melhor forma possível e da forma mais profissional possível.

Referências

- [1] da Silva Amaral¹, P., dos Santos Barbosa, R., & dos Santos Correia, S. M. B. **A IMPORTÂNCIA DA AUTOMAÇÃO NOS LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS.**
- [2] jaleko-blog-files.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2019/11/06174353/Esquema-ilustrando-os-componentes-da-parede-celular-de-bacterias-Gram-positivas-e-Gram-negativas.png
- [3] Beveridge, T. J. (2001). **Use of the Gram stain in microbiology.** *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.
- [4] Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). **Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology.** *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 208-236.
- [5] Yarbrough, M. L., Wallace, M. A., Marshall, C., Mathias, E., & Burnham, C. A. D. (2016). **Culture of urine specimens by use of chromID CPS Elite medium can expedite Escherichia coli identification and reduce hands-on time in the clinical laboratory.** *Journal of clinical microbiology*, 54(11), 2767-2773.
- [6] Power, D. A., & Johnson, J. A. (2009). Difco™ & BBL™ manual. **Manual of Microbiological Culture Media**, 359-60.
- [7] Binghuai, L., Yanli, S., Shuchen, Z., Fengxia, Z., Dong, L., & Yanchao, C. (2014). **Use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of group B Streptococcus on chromID Strepto B agar.** *International Journal of Infectious Diseases*, 27, 44-48.
- [8] Lopes, H. V., & Tavares, W. (2005). **Diagnóstico das infecções do trato urinário.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, 51(6), 306-308.
- [9] Rodrigues, T. M., Grieco, A. S., Simões, F. A., & Castilho, L. N. (2010). **Infecção urinária.** *RBM*, 67(12), 100-109.
- [10] CASTILHO, V. L. P., FRANÇA, I. L., & de Araujo MONTEIRO, C. J. (1980). **DE RITCHIE, PARA EXAME PARASITOLÓGICO DAS FEZES.** *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 23(6), 319-322.

- [11] Altenburg, F. L., Biondo-Simões, M. D. L. P., & Santiago, A. (2007). **Pesquisa de sangue oculto nas fezes e correlação com alterações nas colonoscopias.** *Revista Brasileira de Coloproctologia*, 27, 304-309.
- [12] MacWilliams, M. P. (2012). **Indole test protocol.** *American Society for Microbiology, Washington, DC.*
- [13] Taylor, W. I., & Achanzar, D. (1972). **Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae.** *Applied microbiology*, 24(1), 58-61.
- [14] Reiner, K. (2010). **Catalase test protocol.** *American society for microbiology*, 1-6.
- [15] Shields, P., & Cathcart, L. (2010). **Oxidase test protocol.**
- [16] Wisdom, G. B. (1976). **Enzyme-immunoassay.** *Clinical chemistry*, 22(8), 1243-1255.
- [17] Cox, K. L., Devanarayan, V., Kriauciunas, A., Manetta, J., Montrose, C., & Sittampalam, S. (2019). **Immunoassay methods.** *Assay Guidance Manual [Internet].*
- [18] García-Campaña, A. M., & Baeyens, W. R. G. (2000). **Principles and recent analytical applications of chemiluminescence.** *Analisis*, 28(8), 686-698.
- [19] Chen, W., Jie, W. U., Chen, Z. O. N. G., Jie, X. U., & Huang-Xian, J. U. (2012). **Chemiluminescent immunoassay and its applications.** *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(1), 3-10.
- [20] Hyun, J., Ko, D. H., Kang, H. J., Whang, D. H., Cha, Y. J., & Kim, H. S. (2016). **Evaluation of the VIDAS anti-HCV assay for detection of hepatitis C virus infection.** *Annals of laboratory medicine*, 36(6), 550-554.
- [21] Shekarchi, I. C., Sever, J. L., Nerurkar, L., & Fuccillo, D. (1985). **Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with enzyme-linked fluorescence assay with automated readers for detection of rubella virus antibody and herpes simplex virus.** *Journal of clinical microbiology*, 21(1), 92-96.
- [22] van Hage, M., Hamsten, C., & Valenta, R. (2017). **ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 974-977.
- [23] De Almeida, J. R. C., de Lima Pedrosa, N., Leite, J. B., do Prado Fleming, T. R., de Carvalho, V. H., & Cardoso, A. D. A. A. (2007). **Marcadores tumorais: revisão de literatura.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 305-316.

- [24] Bates, S. E. (1991). **Clinical applications of serum tumor markers.** *Annals of internal medicine*, 115(8), 623-638.
- [25] Murugavel, K. G., Mathews, S., Jayanthi, V., Shankar, E. M., Hari, R., Surendran, R., ... & Thyagarajan, S. P. (2008). **Alpha-fetoprotein as a tumor marker in hepatocellular carcinoma: investigations in south Indian subjects with hepatotropic virus and aflatoxin etiologies.** *International Journal of Infectious Diseases*, 12(6), e71-e76.
- [26] Malati, T. (2007). **Tumour markers: An overview.** *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(2), 17-31.
- [27] Jacobs, I., & Bast Jr, R. C. (1989). **The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature.** *Human reproduction*, 4(1), 1-12.
- [28] Molina, R., Augé, J. M., Escudero, J. M., Filella, X., Zanon, G., Pahisa, J., ... & Velasco, M. (2010). **Evaluation of tumor markers (HER-2/neu oncoprotein, CEA, and CA 15.3) in patients with locoregional breast cancer: prognostic value.** *Tumor Biology*, 31(3), 171-180.
- [29] Molina, R., Zanón, G., Filella, X., Moreno, F., Jo, J., Daniels, M., ... & Ballesta, A. M. (1995). **Use of serial carcinoembryonic antigen and CA 15.3 assays in detecting relapses in breast cancer patients.** *Breast cancer research and treatment*, 36(1), 41-48.
- [30] Filella, X., Molina, R., Grau, J. J., Pique, J. M., Garcia-Valdecasas, J. C., Astudillo, E., ... & Campo, E. (1992). **Prognostic value of CA 19.9 levels in colorectal cancer.** *Annals of surgery*, 216(1), 55.
- [31] Grunnet, M., & Sorensen, J. B. (2012). **Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer.** *Lung cancer*, 76(2), 138-143.
- [32] Stenman, U. H., Alfthan, H., & Hotakainen, K. (2004). **Human chorionic gonadotropin in cancer.** *Clinical biochemistry*, 37(7), 549-561.
- [33] Castro, H. A. S. D., Iared, W., Shigueoka, D. C., Mourão, J. E., & Ajzen, S. (2011). **Contribuição da densidade do PSA para prever o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2, 6 e 10, 0 ng/ml.** *Radiologia Brasileira*, 44, 205-209.

- [34] Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2012). **Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers.** *Science translational medicine*, 4(127), 127rv3-127rv3.
- [35] De Angelis, G., Rittenhouse, H. G., Mikolajczyk, S. D., Shamel, L. B., & Semjonow, A. (2007). **Twenty years of PSA: from prostate antigen to tumor marker.** *Reviews in urology*, 9(3), 113.
- [36] Rosenblum, M. D., Remedios, K. A., & Abbas, A. K. (2015). **Mechanisms of human autoimmunity.** *The Journal of clinical investigation*, 125(6), 2228-2233
- [37] Förger, F., Matthias, T., Oppermann, M., Becker, H., & Helmke, K. (2004). **Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis.** *Lupus*, 13(1), 36-44.
- [38] Abeles, A. M., & Abeles, M. (2013). **The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result.** *The American journal of medicine*, 126(4), 342-348.
- [39] Johansson, S. G. O. (2004). **ImmunoCAP® Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis.** *Expert review of molecular diagnostics*, 4(3), 273-279.
- [40] Dzantiev, B. B., Byzova, N. A., Urusov, A. E., & Zherdev, A. V. (2014). **Immunochemical methods in food analysis.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 55, 81-93.
- [41] Lee, J. H., Lim, C. S., Lee, M. G., & Kim, H. S. (2014). **Comparison of an automated rapid plasma reagin (RPR) test with the conventional RPR card test in syphilis testing.** *BMJ open*, 4(12), e005664.
- [42] Nielsen, S. F., Bojesen, S. E., Schnohr, P., & Nordestgaard, B. G. (2012). **Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study.** *Bmj*, 345.
- [43] Zantek, N. D., Koepsell, S. A., Tharp Jr, D. R., & Cohn, C. S. (2012). **The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis.** *American journal of hematology*, 87(7), 707-709.)
- [44] Jennifer Matthews, R. N., & Susie Newton, R. N. (2010). **The Coombs Test.** *Clinical journal of oncology nursing*, 14(2), 143.

