



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Soares Freire da Silva

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Cristina dos Santos Luxo Maia e pelo Doutor Américo Lopes de Freitas e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022



Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Inês Soares Freire da Silva

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas  
orientado pela Professora Doutora Cristina dos Santos Luxo Maia e pelo Doutor  
Américo Lopes de Freitas e apresentado à Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Coimbra**

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



“Saúde não é só o resultado dos nossos atos.  
É também dos nossos pensamentos.”

**Mahatma GANDHI**



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais por me terem dado a oportunidade de ir para a faculdade e prosseguir com a minha formação académica. Ao longo destes anos estiveram sempre do meu lado e nunca me deixaram desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Gostaria também de agradecer ao João e aos meus amigos por todo o apoio, companheirismo e interajuda demonstrado ao longo destes anos. Sem vocês o meu percurso académico não teria sido o mesmo.

Agradeço também ao Dr. Américo Freitas e a toda a equipa do Laboratório Médico Avelab por me terem recebido de braços abertos, por me terem orientado durante os 6 meses de estágio e pela formação que me foi inculcida tanto a nível profissional como pessoal.

Por fim gostaria de agradecer à Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Luxo Maia por toda a orientação e disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas durante a elaboração deste relatório. À professora Ana Miguel Duarte Matos da Silva, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, por se encontrar sempre disponível para nos ajudar e orientar ao longo de todo o mestrado.





# ÍNDICE

<b>1 Introdução</b> .....	<b>19</b>
<b>2 Caracterização do laboratório de Estágio</b> .....	<b>20</b>
<b>3 Processamento de Amostras</b> .....	<b>22</b>
3.1 Fase pré-analítica .....	22
3.2 Fase-analítica .....	23
3.3 Fase pós-analítica .....	24
<b>4 Controlo de Qualidade</b> .....	<b>24</b>
4.1 Controlo de Qualidade Interno .....	24
4.2 Controlo de Qualidade Externo .....	25
<b>5 Hematologia</b> .....	<b>26</b>
<b>6 Bioquímica</b> .....	<b>27</b>
<b>7 Microbiologia</b> .....	<b>28</b>
7.1 Triagem de amostra microbiológicas .....	28
7.2 Coloração de Gram .....	29
7.3 Coloração de Ziehl-Neelsen .....	30
7.4 Coloração de Azul de Lactofenol .....	30
7.5 Equipamentos automatizados .....	30
7.5.1 Aution Max Ax-4030 e Sedimax contrast .....	30
7.5.2 BD Phoenix <sup>TM</sup> .....	31
7.6 Método difusão em disco .....	32
7.7 Meios de Cultura .....	32
7.8 Provas de identificação bacteriana .....	35
7.9 Principais Produtos Biológicos .....	36
7.9.1 Urina .....	36
7.9.2 Fezes .....	39
7.9.3 Exsudados Vaginais, Retais e Uretrais .....	41
7.9.4 Exsudados Nasofaríngeos .....	44
7.9.5 Expetoração .....	45
7.10 Serologia Infeciosa .....	47
7.10.1 TPHA E VDRL .....	47
7.10.2 IgM e IgG anti- Helicobacter pylori .....	48
7.10.3 SARS-CoV-2 .....	48
7.11 Validação Médica no setor da Microbiologia .....	49
<b>8 Imunologia Clínica</b> .....	<b>50</b>
8.1 Imunoensaio Competitivo .....	51

8.2	Imunoensaio não competitivos (Sandwich) .....	51
8.3	Métodos instrumentais de Detecção de Imunocomplexos Antígeno-Anticorpo.....	52
8.3.1	Quimioluminescência.....	52
8.3.2	Fotometria .....	52
8.3.3	Potenciometria.....	52
8.4	Marcadores Tumorais .....	53
8.4.1	Antígeno Hidrocarbonado 19-9 .....	54
8.4.2	$\alpha$ -Fetoproteína .....	54
8.4.3	Antígeno Hidrocarbonado 15-3 .....	54
8.4.4	Antígeno Carbohidratado 125.....	55
8.4.5	Antígeno Carcinoembrionário .....	55
8.4.6	Tiroglobulina.....	56
8.4.7	Antígeno Específico da Próstata.....	56
8.4.8	Gonadotrofina Coriônica Humana.....	57
8.5	Vírus da Imunodeficiência Humana .....	57
8.6	Rubéola.....	60
8.7	Toxoplasmose.....	62
8.8	Citomegalovirus.....	64
8.9	Validação de resultados no setor da Imunologia .....	66
<b>9</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>69</b>

## **Abreviaturas e Siglas**

**Ac** - Anticorpo

**Ac Anti-CMV** - Anticorpo contra o Citomegalovírus

**Ac Anti-HIV** - Anticorpo contra o Vírus da Imunodeficiência Humana

**Ac Anti-rubéola** - Anticorpo contra o vírus da rubéola

**Ac Anti-toxoplasma** - Anticorpo contra o *Toxoplasma gondii*

**AEQ** - Avaliação Externa da Qualidade

**AFP** -  $\alpha$ -Fetoproteína

**Ag** - Antigénio

**ATCC** - *American Type Culture Collection*

**BAAR** - Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

**BMP** - Bacteriológico, Micológico e Parasitológico

**CA** - Antigénio Hidrocarbonado

**CA 15.3** - Antigénio Hidrocarbonado 15.3

**CA 19.9** - Antigénio Hidrocarbonado 19.9

**CAM** - Gelose Campyloset

**CEA** - Antigénio Carcinoembrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*

**CHGM** - Concentração de Hemoglobina Globular Média

**CLED** - Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos

**CMV** - Citomegalovírus

**CQE** - Controlo de Qualidade Externo

**CQI** - Controlo de Qualidade Interno

**DGS** - Direção Geral de Saúde

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

**ELISA** - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**ESBL** - Beta-lactamases de Espectro Alargado

**ETEC** - E. coli enterotoxigénica

**EUCAST** - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**FFUC** - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**fPSA** - Antígeno Específico da Próstata livre

**hCG** - Gonadotropina Corionica Humana, *do inglês Human Chorionic Gonadotropin*

**HGM** - Hemoglobina Globular Média

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana, *do inglês Human Immunodeficiency Virus*

**Ig** - Imunoglobulina

**INR** - International Normalized Ratio

**ITU** - Infecção do trato urinário

**LC** - Laboratório Central

**LCR** - Líquido Cefalorraquidiano

**LH** - Hormona Luteínica, *do inglês Luteinizing Hormone*

**LJ** - Meio Löwenstein-Jensen

**MHE** - Gelose de Mueller-Hinton

**MRSA** - *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes

**NK** - Células *Natural killer*

**PSA** - Antígeno Específico da Próstata

**PVX** - Gelose de Chocolate (PolyViteX)

**RDW** - *Red Cell Distribution Width*

**RIQAS** - *Randox International Quality Assessment Scheme*

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**Rpm** - Rotações por minuto

**RT** - Transcriptase Reversa

**SARS-coV-2** - *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

**SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**SS** - Salmonella-Shigella agar

**T3** - Tri-iodotironina

**T4** - Tiroxina

**TODD H-T** - Caldo Todd-Hewitt

**TSA** - Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

**TSH** - Tiroestimulina

**UFC** - Unidade formadora de colónias

**UK NEQAS**- *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

**VDRL** - *Venereal Disease Research Laboratory,*

**VHB** - Vírus da Hepatite B

**VHC** - Vírus da Hepatite C

**VIH** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**VGM** - Volume Globular Médio

**ZN** - Ziehl-Neelsen

**β-hCG** - Gonadotrofina coriônica humana



## Resumo

Neste relatório irei descrever as atividades desenvolvidas no âmbito do estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu no Laboratório de Análises Clínicas Avelab entre Janeiro e Junho de 2021.

A evolução da Ciência permitiu que os laboratórios de análises clínicas se tornassem cada vez mais automatizados, sendo possível processar um maior número de amostras num curto espaço de tempo e obter resultados de forma mais rápida e exata. Deste modo, as análises clínicas tornaram-se uma importante ferramenta de diagnóstico, bem como da monitorização da terapêutica.

No laboratório Avelab tive a possibilidade de colocar em prática os conhecimentos adquiridos no Mestrado de Análises Clínicas, bem como vivenciar a rotina de um laboratório. Durante o estágio curricular adquiri experiência desde a fase pré-analítica até a fase pós-analítica onde executei diferentes técnicas nas áreas de Imunologia, Bioquímica, Microbiologia e Hematologia.

Neste relatório irei descrever o funcionamento das quatro áreas clínicas, dando ênfase as áreas da Microbiologia e Imunologia, uma vez que foram as valências escolhidas no início do estágio curricular. Para além disso irei apresentar alguns casos clínicos que tive a oportunidade de observar e participar no processamento laboratorial.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas; Imunologia; Microbiologia; Avelab





## **Abstract**

In this report I will describe the activities developed in the curricular internship of the master's in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. This internship took place at Avelab Clinical Analysis Laboratory between January and June 2021.

The evolution of science has allowed clinical analysis laboratories to become increasingly automated, making it possible to process a greater number of samples in a short time and obtain results faster and more accurately. In this way, clinical analyses have become an important diagnostic tool, as well as monitoring therapy.

In the lab, I was able to put into practice the theoretical and practical knowledge acquired in the clinical analysis master's degree and experience the routine of a laboratory, having acquired experience from the preparation of the patient to the instrumental phase where I performed different techniques in the areas Immunology, Biochemistry, Microbiology and Hematology.

In this report I will describe the functioning of the four clinical areas, emphasizing the areas of Microbiology and Immunology, since they were chosen at the beginning of the curricular internship. In addition, I will present some clinical cases that I had the opportunity to observe and participate in laboratory processing.

**Keywords:** Clinical Analysis; Immunology; Microbiology; Avelab



# I Introdução

As análises clínicas são uma ferramenta essencial para o diagnóstico, prognóstico e monitorização de diversas doenças, desempenhando deste modo um papel crucial na prestação de cuidados de saúde. A deteção precoce de determinada patologia para além de benéfico para o utente, faz diminuir substancialmente o custo do tratamento. Muitas decisões médicas são apoiadas na interpretação dos boletins de análises, tornando-se crucial que esses resultados sejam exatos, precisos e fidedignos.

Os laboratórios de análises clínicas são cada vez mais automatizados o que permite processar um elevado número de amostras num curto espaço de tempo e deste modo diminuir o tempo entre a colheita de uma amostra e a emissão dos resultados. Para assegurar a monitorização do processo analítico e garantir a segurança dos resultados é importante haver cartas de controlo de qualidade interno e externo.

O Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra complementa a formação teórica com a realização de um estágio curricular que nos permite adquirir experiência prática e deste modo preparar-nos para o mercado de trabalho. O meu estágio foi realizado no Laboratório Médico Avelab, sediado em Aveiro, onde tive oportunidade de acompanhar todo o processo analítico desde a fase pré analítica até à fase analítica.

Neste relatório serão abordadas as quatro áreas clínicas, sendo a Microbiologia e a Imunologia abordadas com maior detalhe uma vez que foram as valências escolhidas no início do estágio.

## 2 Caracterização do laboratório de Estágio

O laboratório Médico Avelab foi criado em 1956 em Aveiro tendo atualmente mais de 70 postos de colheitas distribuídos entre o norte e o centro do país. É considerado um dos laboratórios mais prestigiados do país devido à sofisticada tecnologia utilizada durante a fase analítica. Todo o processo analítico rege-se por um elevado rigor científico.

A Direção do laboratório é assegurada por especialistas em análises clínicas nomeadamente o Dr. Américo Freitas (Diretor Clínico), Dra. Teresa Raposo e por três farmacêuticos especialistas, o Dr. António Ferreira Neves, a Dra. Irene Sá e Dra. Lurdes Pereira.

O laboratório central encontra-se dividido em diferentes setores nomeadamente o da Bioquímica, Imunologia, Hematologia, Microbiologia e Biologia Molecular. O laboratório rege-se por um sistema de controlo de qualidade segundo a norma ISO 900 2015, proporcionando um rigoroso controlo de todos os procedimentos realizados.

O laboratório é também constituído por uma sala de receção para utentes, salas de colheitas para as diferentes amostras biológicas, uma sala de triagem de amostras, gabinetes médicos para validação de resultados, uma área administrativa e salas de desinfeção e lavagem de material. O laboratório possui um horário de funcionamento de segunda a sexta das 7:30h às 19:00h e aos sábados das 8:00h às 13:00. São prestados serviços ao domicílio, como por exemplo a lares, clínicas privadas, empresas no âmbito da medicina do trabalho e à Universidade de Aveiro.

O laboratório central e os diferentes postos de colheita têm no total, aproximadamente 700 utentes por dia. As amostras depois de serem colhidas são acondicionadas e transportadas em arcas refrigeradas para o laboratório central onde são processadas o mais rápido possível para prevenir a deterioração de analitos.

De forma a assegurar o elevado fluxo de amostras e a emissão de resultados num curto período de tempo, os diversos setores estão equipados com inúmeros aparelhos automatizados que se encontram divididos de acordo com as análises desempenhadas pelos mesmos.

Na tabela I estão inumerados os equipamentos existentes no laboratório Avelab, bem como as suas funcionalidades. Para além dos aparelhos automatizados, existe ainda nos diferentes setores microscópios óticos, centrifugas, estufas, congeladores e frigoríficos que

permitem preservar alguns controlos, reagentes e calibradores que necessitam de estar a temperaturas mais baixas assim como os soros, hemogramas e urinas.

O laboratório possui um sistema informático designado de Apollo 3 que permite rastrear todas as amostras que entram para o laboratório para serem analisadas. O sistema informático encontra-se ligado a todos os aparelhos automatizados e permite controlar o processo analítico desde a entrada da requisição médica até à emissão dos resultados.

**Tabela I** - Aparelhos automatizados existentes no Laboratório Avelab e as suas respetivas funções

Área	Equipamentos automatizados	Função
Bioquímica	Architect ci 8200	Medir concentrações de analitos em amostra
	Architect i 1000 plus	Medir concentrações de analitos em amostra
	Capillarys Sebia 2	Eletroforese de proteínas
Imunologia	Architect ci 8200	Medir concentrações de analitos em amostra
	Architect i 1000 plus	Medir concentrações de analitos em amostra
	Phadia 250	Alergénicos e Autoimunidade
Microbiologia	Aution Max AX-4030	Analizador de urina tipo II
	SediMAX conTRUST	Analizador de sedimentos urinários
	BD 100 Phoenix	Identificação e TSA de bactérias
Hematologia	Sysmex XT-2000i	Hemogramas
	Sysmex XE-2100	Hemogramas
	StaRRSed	Velocidade de Sedimentação
	StaRRSed Auto-Compact	Velocidade de Sedimentação
	STA Compact Max2	Teste de Coagulação
	ADAMS A1c HA-8180v	Hb A1C

### 3 Processamento de Amostras

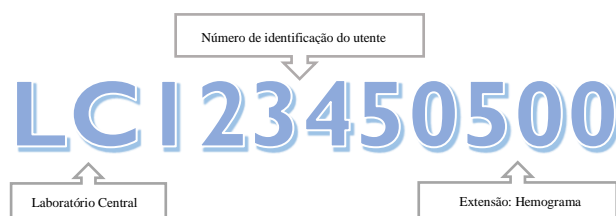
O ciclo de análise de uma amostra compreende as fases desde a requisição médica até à emissão do boletim, estando a fase pré-analítica associada à maioria dos erros. Por este motivo é fundamental que haja um rigoroso controlo dos diversos procedimentos, para que os resultados não contenham erros de importância clínica. A tomada de decisões médicas é apoiada nos diversos testes laboratoriais e como tal estes devem ser precisos e confiáveis. [1]

#### 3.1 Fase pré-analítica

A fase pré-analítica é responsável por 70% dos erros que ocorrem em laboratório. Os erros mais frequentes provêm da má preparação do utente (exemplo: a necessidade de estar ou não em jejum ou a toma de medicação), da colheita da amostra, da má refrigeração dos produtos biológicos e da incorreta preparação da análise.

O transporte da amostra deve ser feito o mais rápido possível para o local de processamento para garantir a preservação dos analitos e evitar o efeito do aumento da temperatura e o contacto com células sanguíneas. Durante o estágio no laboratório Avelab pude verificar que a ocorrência de erros é mínima uma vez que todos os profissionais de saúde são experientes e há uma padronização dos procedimentos realizados.

Quando um utente chega ao laboratório é introduzida a credencial médica em sistema Apollo onde é automaticamente definido uma ou várias etiquetas, com um código alfanumérico que identificará o utente ao longo de todo o processo analítico (Figura I). Neste momento é explicado ao utente caso seja necessário, como deve realizar a colheita de fezes consoante a análise pedida, a colheita de urina e se é necessário estar em jejum.



**Figura I:** Exemplo de um código alfanumérico atribuído a cada utente no Laboratório Avelab

De seguida, o utente é encaminhado para uma das salas de colheitas, onde são colhidas diferentes amostras biológicas como sangue, zangãos vaginais, retais, ar expirado para o diagnóstico de infeção gastroduodenal por *Helicobacter pylori*, entre outras. Todos os procedimentos realizados no laboratório Avelab seguem as normas da DGS.

Antes de se iniciar a colheita, todos os tubos são devidamente etiquetados para que não existam trocas de amostras entre utentes. Posteriormente todos os produtos biológicos provenientes do laboratório central e dos diferentes postos de colheitas são encaminhados para a sala de triagem onde são distribuídos pelos respetivos setores. Os tubos de soro são os únicos que são triados e centrifugados nesta sala antes de serem encaminhados para o setor da bioquímica. A triagem é crucial para verificar se todos os produtos que chegam ao laboratório estão devidamente identificados, se têm volume suficiente, se existem soros hemolisados ou coagulados e para verificar se não há troca de etiquetas (como por exemplo uma urina identificada com um código de soro).

Os soros são centrifugados na sala de triagem e de seguida são retiradas alíquotas para análises realizadas no Avelab como VDRL, TPHA, Coombs, ácidos nucleares, teste de R Paul-Bunnell e alíquotas para análises realizadas em dois laboratórios no exterior, Ambar e Cerba, ambos sediados em Barcelona. Para estes laboratórios são enviadas amostras com análises à vitamina C, catecolaminas, 1,25-dihidroxi-vitamina D, teste respiratório e IgM anti-*Helicobacter pylori*, entre outras. Para que não haja contaminação nem deterioração das amostras estas são bem acondicionadas e conservadas durante o transporte.

### **3.2 Fase-analítica**

A fase analítica possui a menor percentagem de erros uma vez que a maioria dos setores de um laboratório são automatizados. Os erros nesta fase devem-se principalmente a reagentes preparados incorretamente, diluições e pipetagens inadequadas, reagentes armazenados inadequadamente (exemplo: creatinina refrigerada quando deve estar à temperatura ambiente), reagentes expirados, equipamentos mal calibrados e controlados, entre outros.

No laboratório Avelab os equipamentos são calibrados e controlados diariamente ou quando há alteração de lote ou de reagente, para que os resultados não contenham erros de importância clínica.

### **3.3 Fase pós-analítica**

Na fase pós-analítica ocorre a validação dos resultados laboratoriais por parte dos especialistas. [2] Após a validação, os resultados são enviados para o utente para depois estes serem avaliados pelo clínico que os interpreta. [3] Os erros mais frequentes nesta fase são a validação de boletins incompletos, problemas técnicos no software, falta de concordância entre os diferentes parâmetros, incorreta interpretação dos resultados, entre outros.

No laboratório Médico Avelab os resultados são validados primeiramente pelo técnico responsável pelo setor e de seguida validados pelos especialistas de forma a minimizar a ocorrência de erros. Em casos de patologia grave, o utente ou o clínico são contactados para que sejam tomadas medidas rapidamente.

## **4 Controlo de Qualidade**

Os laboratórios de análises clínicas têm a obrigação de assegurar a qualidade de todas as fases do ciclo analítico (pré-analítica, analítica e pós-analítica) bem como de todos os procedimentos de controlo que incluem o controlo de qualidade interno e o controlo de qualidade externo. [4]

### **4.1 Controlo de Qualidade Interno**

O controlo de qualidade interno (CQI) tem como objetivo monitorizar e identificar os erros presentes nos ensaios quantitativos e qualitativos de modo a assegurar a validade e a segurança dos resultados.

No laboratório Médico Avelab, os equipamentos são calibrados e controlados diariamente e sempre que há alteração no número do lote de um reagente ou na troca deste. Após a passagem dos controlos dos diferentes parâmetros analíticos são avaliadas as respetivas cartas de controlo de qualidade interna que são definidas para 2 desvios padrões (2s), quando aplicada a regra Westgard.

Sendo assim se 2 valores consecutivos excederem os dois desvios ( $\pm 2SD$  ( $>|2SD|$ )) estamos perante um possível erro sistemático como por exemplo algum problema com um calibrador cuja causa deve ser investigada. Após a resolução do problema analisa-se novamente os controlos e caso estejam em ordem pode-se iniciar a processamento das amostras.



## 4.2 Controlo de Qualidade Externo

O controlo de qualidade externo é realizado por uma entidade externa CQE que avalia a qualidade dos resultados do laboratório em estudo. A amostra biológica e os ensaios requeridos são enviados pela organização externa e apresentam características desconhecidas. [4] A amostra em estudo é processada do mesmo modo que uma amostra rececionada em laboratório.

No laboratório Médico Avelab o controlo de qualidade externo é realizado por dois programas de avaliação externa, o RIQAS “*Randox International Quality Assessment Scheme*” e o UK NEQAS “*United Kingdom National External Quality Assessment Service*”.

Se os resultados enviados não estiverem corretos, a entidade avaliadora notifica o laboratório para este fazer uma avaliação dos erros cometidos e proceder à respetiva correção.

## 5 Hematologia

A Hematologia Clínica destina-se ao estudo da morfologia de diversas células sanguíneas como leucócitos, eritrócitos, plaquetas, bem como dos órgãos que as produzem (órgãos hematopoiéticos). Deste modo, a hematologia clínica permite a monitorização e diagnóstico de diversas patologias nomeadamente anemias, mieloma múltiplo, linfomas, leucemias e avalia alterações na cascata da coagulação.

No setor da Hematologia do Laboratório Avelab é realizado primeiramente as calibrações e controlos antes do processamento das amostras. Todos os dias são rececionados cerca de 500 tubos de sangue total.

O tubo de tampa roxa contém EDTA que é um anticoagulante que permite preservar a morfologia das células. O tubo de tampa azul contém citrato de sódio, utilizado como tampão.

Os tubos que contém EDTA são utilizados para avaliar diversos parâmetros nomeadamente hemograma, hemoglobina glicada A1c, velocidade de sedimentação, grupo sanguíneo, prova de Coombs, entre outros.

Os tubos que contém citrato de sódio são por sua vez utilizados em estudos que avaliam a coagulação do plasma nomeadamente, tempo de protrombina com o respetivo cálculo do INR, tempo de trombolastina parcial ativada, testes de dímero D, doseamento de fibrinógeno, entre outros.

Os hemogramas são realizados em 2 aparelhos distintos: o Sysmex XT-2000i e Sysmex XE-2100. Estes aparelhos conseguem quantificar diversos parâmetros do hemograma como os eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos. Outras constantes eritrocitárias como o hematócrito, CHGM, VGM, RDW, HGM são também avaliadas automaticamente.

Caso haja alguma alteração significativa no hemograma é realizado um esfregaço de sangue periférico manual para avaliar a morfologia das células e realizar a contagem diferencial das mesmas. Após todos os parâmetros serem analisados, estes são validados em Apollo por médicos ou por especialistas em análises clínicas.

## 6 Bioquímica

A Bioquímica Clínica tem como objetivo a monitorização, diagnóstico e prevenção de diversas doenças através da análise de soro ou plasma. No setor da bioquímica os equipamentos automatizados utilizados são o Architecti8200, o Architect i 1000 plus e o Capillarys Sebia 2. No Architecti8200 é realizado primeiramente a manutenção diária da química e da imunologia. A manutenção semanal é feita apenas quando é recebido pelo equipamento o pedido do procedimento.

Os consumíveis e os reagentes em falta ou com volume baixo são substituídos e logo de seguida é realizado as calibrações e os respetivos controlos. A calibração do ionograma tanto no soro como na urina tem que ser realizada diariamente e não só quando esta expira. Para além disso é efetuado diariamente os controlos gerais tanto da química como da imunologia.

No Architectci8200 são analisados diversos parâmetros como o ionograma (potássio, sódio e cloro), proteínas totais, componentes virais, marcadores tumorais e cardíacos e diversos perfis (lipídico, renal, endócrino, hepático e pancreático).

O Capillarys Sebia 2 realiza a eletroforese capilar das proteínas. As moléculas são separadas de acordo com a sua mobilidade eletroforética na presença de um pH pré-definido e de um tampão alcalino.

Todos os dias são rececionados cerca de 700 tubos de soro que contêm na parede interna partículas de sílica que ativam a cascata de coagulação e um gel que separa o soro dos glóbulos vermelhos durante a centrifugação permitindo deste modo a estabilidade da amostra. Isto ocorre uma vez que a densidade do gel é inferior a densidade do soro e superior à densidade dos glóbulos vermelhos. [5]

Após todos os parâmetros serem analisados, são validados primeiramente pelos técnicos do setor e de seguida são validados pelos médicos ou especialista via Apollo. Caso haja alguma alteração significativa num parâmetro ou conjunto de parâmetros o utente é imediatamente contactado de forma a dirigir-se a uma unidade de saúde.

## **7 Microbiologia**

Os microrganismos como bactérias, fungos e vírus existem na natureza como populações que ao interagirem entre si originam comunidades microbianas.

O ser humano é colonizado por milhares de microrganismos que estabelecem relações de simbiose com as células humanas de modo a proteger-nos de agressões externas. Contudo alterações no estilo de vida, uso de fármacos, intervenções cirúrgicas, destruição de barreiras físicas e fatores genéticos, alteram a microbiota fazendo com que esta passe a exercer efeitos patológicos.

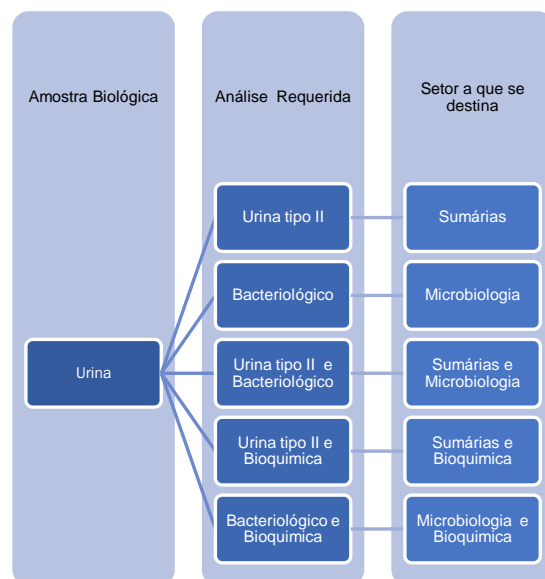
Nos laboratórios de Microbiologia são realizados diversos procedimentos que permitem isolar diferentes microorganismos, para de seguida serem determinadas as resistências e sensibilidades aos antibióticos. Este procedimento é fundamental para que não haja o uso excessivo de fármacos.

No laboratório Avelab o controlo de qualidade interno avalia os meios de cultura, os reagentes e a solução fisiológica utilizada nas suspensões bacterianas. O CQI utiliza estirpes American Type Culture Collection (ATCC) de forma a garantir a precisão e exatidão na execução dos testes de identificação bacteriana e dos respetivos TSA.

O controlo de qualidade externo é realizado através do processamento de uma amostra bacteriológica e micológica enviada por uma entidade externa. A amostra é acompanhada de informação clínica pertinente e é processada como uma amostra de um utente. Os resultados são depois reportados à entidade externa de forma a avaliar qualidade dos mesmos.

### **7.1 Triagem de amostra microbiológicas**

O setor da Microbiologia no laboratório Médico Avelab recebe diariamente uma variedade de amostras para análise microbiológica nomeadamente, urinas, fezes, exsudados vaginais, exsudados retais, exsudados uretrais, expectoração, exsudados nasofaríngeos, exsudados purulentos, fragmentos de unhas, entre outros. As amostras antes de serem triadas e processadas passam por um exame macroscópico onde se verifica se têm volume suficiente, se foram colhidas no recipiente correto e se estão devidamente identificadas. Caso algum destes parâmetros não esteja em conformidade, a amostra é rejeitada e pede-se uma nova colheita. Por fim dá-se entrada das amostras no sistema Apollo e prossegue-se com a análise das mesmas. No caso das amostras urinárias, estas são encaminhadas para diferentes setores consoante as análises requeridas (Figura II). Relativamente aos outros produtos biológicos, estes são encaminhados para o setor da Microbiologia onde são processados.



**Figura II-** Setor ao qual se destina as amostras urinárias e a respectiva análise requerida

## 7.2 Coloração de Gram

Nos laboratórios de Microbiologia, na grande maioria das vezes, é realizado uma coloração de Gram após o exame macroscópico. Esta coloração permite distinguir bactérias Gram negativas de bactérias Gram positivas de acordo com a coloração que adquirem, que se deve às características da parede celular. [7]

As bactérias Gram positivas são constituídas por uma camada espessa de peptidoglicano, uma membrana citoplasmática, proteínas e ácidos lipoteicóicos e teicóicos que possuem função de aderência. A camada de peptidoglicano confere rigidez à parede celular, protege da lise e retém o violeta de genciana (corante primário) assim como o mordente (solução de iodo). O violeta de genciana fica retido após a adição do diferenciador (álcool acetona), uma vez que a sua parede celular possui um número reduzido de lípidos, conferindo a estas bactérias um tom roxo.

Por outro lado, as bactérias Gram negativas possuem uma membrana externa, uma camada fina de peptidoglicano, lipopolissacarídeos, proteínas e aquaporinas por onde entram as moléculas hidrofílicas e a maioria dos antibióticos. Estas bactérias ficam descoradas após a adição do álcool-acetona uma vez que este penetra rapidamente na membrana externa, sendo a fina camada de peptidoglicano incapaz de impedir a passagem desse solvente, promovendo a fácil remoção do violeta de genciana. No entanto ficam coradas de cor-de-rosa devido à fucsina de Ziehl diluída.

Por último, após a lavagem e secagem, estes esfregaços são observados ao microscópio óptico de campo claro na objetiva de imersão (100x). Esta coloração permite distinguir

bactérias Gram positivas de Gram negativas de acordo com a sua morfologia (cocos ou bacilos) e tipo de agrupamento (cocos, diplococos, estreptococos, estafilococos, bacilos, cocobacilos, diplobacilos e estreptobacilos).

### **7.3 Coloração de Ziehl-Neelsen**

Determinadas bactérias possuem na parede celular elevadas concentrações de ácidos micólicos (moléculas hidrofóbicas) que impedem a entrada de corantes como o violeta de genciana e cristal violeta no interior da célula bacteriana. [8] A coloração de Ziehl-Neelsen permite observar e identificar estas bactérias.

Inicialmente é adicionado fucsina de Ziehl à lâmina que é continuamente aquecida até emitir vapores. Os bacilos absorvem a fucsina conferindo-lhes uma coloração avermelhada. A adição de álcool-ácido (diferenciador) descora todos os elementos celulares à exceção destes bacilos, daí estas bactérias serem denominadas de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR). Por fim é adicionado azul-de-metileno que cora todos os elementos descorados anteriormente.

### **7.4 Coloração de Azul de Lactofenol**

O corante azul de lactofenol é usado para corar elementos fúngicos em amostras de cabelos, pelos, escamas de pele e unhas, sendo esta última a amostra mais analisada no laboratório Avelab.

### **7.5 Equipamentos automatizados**

No setor da Microbiologia existem vários equipamentos como centrifugas, estufas, câmaras de fluxo laminar, microscópios e aparelhos automatizados como o Aution Max Ax-4030, Sedimax conTRUST e o Phoenix.

#### **7.5.1 Aution Max Ax-4030 e Sedimax contrast**

O Aution Max e o Sedimax encontram-se interligados de forma a funcionar como uma cadeia de urianálise. Estes aparelhos analisam respetivamente a urina tipo II e o sedimento urinário. O Aution Max através de tiras teste analisa diversos parâmetros nomeadamente a cor, turvação, leucócitos, nitritos, bilirrubina, urobilinogénio, proteínas, glicose, cetonas, pH, sangue e densidade da urina. [9]

Se algum parâmetro na tira se encontrar alterado, o Sedimax conTRUST centrifuga a amostra durante 10 segundos a 2000 rpm e pipeta para uma cassete 200 microlitros de urina para a observação de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, bactérias, cilindros patológicos, diversos tipos de cristais e leveduras. O método utilizado é a microscopia de campo claro e de contraste.

### 7.5.2 BD Phoenix™

O BD Phoenix™ é um aparelho automatizado que utiliza a técnica de microdiluição em caldo para determinar a suscetibilidade das bactérias aos diferentes antibióticos. Possui um indicador redox que deteta o crescimento, metabolismo bacteriano e realiza medições sucessivas das alterações ocorridas no indicador e na turvação do meio. Cada painel de teste de suscetibilidade antimicrobiana contém vários agentes antimicrobianos onde é determinada a concentração mínima inibitória.

O microrganismo em estudo é previamente identificado como Gram negativo ou Gram positivo. De seguida as colónias são suspensas num caldo de identificação, com o auxílio de um nefelómetro até atingirem uma turvação de 0,5 Mac Farland. Por fim com o auxílio de uma pipeta são retirados 25 uL do caldo de identificação para o tudo AST (teste de suscetibilidade antimicrobiana) ao qual foi adicionado previamente uma gota de indicador AST que lhe confere uma cor azul.

Como referido anteriormente, o Phoenix através de mudanças contínuas no indicador, bem como na turvação bacteriana, determina a presença ou ausência de crescimento bacteriano. Na presença de crescimento bacteriano o indicador sofre uma redução adquirindo cor rosa, indicativo de resistência ao agente antimicrobiano. Na ausência de crescimento bacteriano não há redução do indicador nem mudança de cor. O Phoenix interpreta o resultado dos testes antimicrobianos contidos no painel. De acordo com o organismo identificado, indica as sensibilidades ou resistências aos antibióticos. Por fim os resultados são validados pelos médicos ou técnico superior. [10]

**Tabela II-** Painéis de identificação e respetivo TSA utilizados no setor da Microbiologia do Laboratório Avelab

Família ou Espécie	Painel	Tubos de identificação	Padrão Mc Farland
<i>Escherichia coli</i> ou <i>Proteus mirabilis</i>	409	ID+AST+Indicador	0,48-0-58
Enterobacteriaceae	ID-409		
Pseudomonadaceae	ID-415		
Outros BGN não Enterobacterales			
<i>Staphylococcus</i> spp.	ID-88	ID+AST+Indicador S	
<i>Enterococcus</i> spp.+ <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>			
<i>Streptococcus</i> spp.	ID-11		

## 7.6 Método difusão em disco

O método automatizado é extremamente importante porque permite a um laboratório processar um maior número de amostras num curto período de tempo, aumentar a segurança com a automatização e permite obter resultados mais precisos. No entanto no caso da ocorrência de problemas técnicos com o aparelho ou no caso de este identificar *Klebsiella* spp. com possibilidade de produzir carbapenemases é necessário realizar o TSA manualmente.

O TSA manual utiliza o método Kirby-Bauer (método difusão em disco) em gelose Mueller-Hinton. Em primeiro lugar são escolhidos os discos de antibióticos a usar consoante a bactéria previamente identificada. De seguida uma colónia pura é suspensa em solução salina até atingir uma turvação de 0,5 Mac Farland.

Após a aplicação do inóculo bacteriano em gelose Mueller-Hinton através da técnica de sementeira em toalha são colocados os discos impregnados de antibióticos. O meio de cultura é incubado a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24h.

O antibiótico difunde para o meio em gradiente de concentração até ocorrer a formação de um halo em torno do disco que indica que a bactéria atingiu a concentração de antibiótico que inibe o seu crescimento.

Por fim são medidos os halos formados em torno do disco (onde não há crescimento de microrganismos). Os valores obtidos são comparados com os valores das tabelas do EUCAST para determinar as sensibilidades e resistências aos antibióticos.

O método manual deve ser padronizado para permitir a comparação com outros laboratórios. Durante o estágio curricular tive a oportunidade de processar amostras usando o método automatizado como o método manual.

## 7.7 Meios de Cultura

Após a observação microscópica da morfologia das bactérias, realiza-se o exame cultural. Este exame tem como objetivo promover o crescimento de colónias puras para proceder-se à identificação das mesmas através do antibiograma. A escolha dos meios de cultura depende das características morfológicas, tipo de agrupamento e da coloração de Gram da bactéria em estudo.

Vários fatores, nomeadamente o pH, humidade, temperatura e percentagem de  $\text{CO}_2$ , influenciam o crescimento bacteriano após a inoculação da amostra no respetivo meio de cultura. A grande maioria das bactérias em estudo são incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas. No laboratório Avelab, as placas inoculadas são colocadas numa estufa a uma temperatura de  $36^{\circ}\text{C}$ . Contudo, existem algumas exceções, nomeadamente na incubação de



espécies fastidiosas como o *Streptococcus pneumoniae* ou *Neisseria gonorrhoeae* onde é necessária uma atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>.

Os meios de cultura podem ser sólidos ou líquidos. Nos sólidos observa-se o fim do crescimento bacteriano devido ao consumo dos nutrientes. Nos meios líquidos ocorre a turbação do meio e uma melhor difusão de metabolitos.

No laboratório Avelab são usados diferentes meios: meios seletivos que permitem o crescimento do microrganismo em estudo inibindo o crescimento das restantes bactérias presentes na amostra, os meios não seletivos que permitem o crescimento da maioria dos microrganismos, os meios de enriquecimento (caldos ou meios sólidos) que possuem componentes altamente nutritivos que aceleram o crescimento de determinada bactéria patogénica e por fim os meios diferenciais que contêm componentes que diferenciam diferentes colónias através de mudanças de cor potenciadas por reações bioquímicas.

### Características dos meios e caldos utilizados no laboratório Avelab

#### **CHROMagar orientation**

Meio cromogénico que permite a diferenciação e identificação de inúmeras bactérias patogénicas responsáveis por infeções urinárias. Permite a identificação de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sem teste confirmatório. [11]

#### **Gelose de chocolate (PVX)**

Meio que favorece o crescimento de *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. [4]

#### **Manitol salgado**

Meio seletivo utilizado no isolamento de estafilococos e na identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*.

#### **Gelose de sangue**

Meio enriquecido e diferencial, que permite a deteção de microrganismos fastidiosos.

#### **Salmonella-Shigella agar (SS)**

A Salmonella-Shigella agar é um meio seletivo e diferencial utilizado na pesquisa de bacilos patogénicos pertencentes ao género *Salmonella* e *Shigella*.

#### **Gelose CLED**

Meio de cultura diferencial, não seletivo, utilizado no isolamento de bactérias associadas a infeções urinárias, permitindo a contagem e diferenciação dos diversos microrganismos.

## **Gelose Mueller-Hinton**

Meio sólido, não seletivo, usado principalmente no estudo da sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco. [4]

## **ChromID MRSA SMART**

Meio seletivo e diferencial que permite a detecção de *Staphylococcus aureus* resistente ou não à meticilina.

## **ChromID StreptoB**

Meio seletivo para *Streptococcus* do grupo B, em particular para *Streptococcus agalactea*. [12]

## **Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol**

Meio seletivo utilizado no isolamento de fungos filamentosos e leveduras.

## **Candida Select**

Meio diferencial e seletivo usado no isolamento de leveduras. Permite identificar a espécie *Candida albicans* e diferenciar presuntivamente outras espécies como por exemplo *Candida tropicalis* e *C. krusei*.

## **Levine**

Meio seletivo usado no isolamento de enterobactérias Gram-negativas.

## **Gelose Campyloset**

Meio seletivo para *Campylobacter* spp. em amostra de fezes.

## **Caldo de Selenito**

Caldo de enriquecimento para *Salmonella* em amostra de fezes, inibindo o crescimento de flora polimicrobiana.

## **Columbia**

Meio seletivo para o isolamento de bactérias Gram positivas como por exemplo estafilococos e estreptococos.

## **Caldo Todd-Hewitt**

Caldo de enriquecimento para *Streptococcus* do grupo B a partir de exsudados vaginais e retais. Meio composto por antibióticos que inibem as bactérias Gram negativas.

## **Meio Löwenstein-Jensen (LJ)**

Meio seletivo que permite o isolamento e diferenciação de micobactérias.

## 7.8 Provas de identificação bacteriana

Após a incubação dos meios de cultura durante 18-24h são analisadas as características macroscópicas das colónias bacterianas, nomeadamente a cor, cheiro, forma, produção de muco, de H<sub>2</sub>S (sulfureto de hidrogénio), entre outras. Na ausência de crescimento bacteriano, as culturas são incubadas mais 24h, uma vez que algumas bactérias só positivam ao fim de 48h. No caso dos fungos filamentos o tempo de incubação é de 21 a 30 dias a 30°C.

Se os meios de culturas utilizados não diferenciarem as espécies em estudo, são realizadas provas bioquímicas manuais que auxiliam na identificação das respetivas bactérias.

No laboratório Médico Avelab são realizadas provas manuais e provas automatizadas (no aparelho BD 100 Phoenix). Quando uma amostra de urina é semeada em CHROMOagar Orientation e ao fim de 18-24h é possível identificar com rigor a bactéria responsável pela infeção (exemplo: *Escherichia coli*), não é necessário a realização de provas automatizadas.

### Provas bioquímicas frequentemente realizadas no Laboratório Avelab

#### **Teste do Indol**

O teste do indol avalia a capacidade das bactérias em produzir indol, ácido pirúvico e amónio através da desaminação redutiva do triptofano. O reagente de Kovacs (reagente composto por álcool isoamílico, para-dimetilaminobenzaldeído e ácido clorídrico concentrado) deteta a produção de indol, formando um anel de coloração rosa na superfície do meio (exemplo: *Escherichia coli*). Numa reação negativa, o triptofano não é hidrolisado e por sua vez não há mudança de cor (exemplo: *Proteus mirabilis*). [12]

#### **Teste da Catalase**

A catalase é uma enzima que decompõem o peróxido de hidrogénio (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água (2H<sub>2</sub>O) e oxigénio (O<sub>2</sub>). [4] Numa reação positiva ocorre a libertação de gás (formação de bolhas) devido ao contacto do peróxido de hidrogénio com uma colónia isolada (ex: colónias puras de *Staphylococcus* spp.). Numa reação negativa não ocorre a libertação de gás (ex: colónias puras de *Streptococcus* spp).

#### **Teste da Coagulase**

A coagulase é uma enzima termoestável produzida pelo *Staphylococcus aureus*. Existem duas formas de coagulase: a que se encontra ligada à parede celular e a libertada pelas células bacterianas. Na primeira as bactérias formam agregados devido ao contacto do fibrinogénio plasmático com o coágulo. No segundo a coagulase (que apresenta atividade similar a protrombina) converte o fibrinogénio num coágulo de fibrina. [4]

## Teste da Oxidase

O citocromo oxidase é uma enzima produzida por algumas bactérias Gram negativas. Numa reação positiva ocorre a produção de azul de indofenol a partir da oxidação de dimetil-p-fenilenodiamina e  $\alpha$ -naftol como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*. Numa reação negativa não ocorre a produção de nenhuma coloração como é o caso da *Escherichia coli*. [13]

## Teste TDA

Esta prova permite a detecção de triptofano desaminase (TDA) em meio ureia indol após a adição de cloreto férrico. É usado na identificação presuntiva de Enterobacteriaceae, permitindo distinguir o *Proteus mirabilis* (TDA positivo) de outras Enterobacteriaceae (TDA negativo). Numa reação positiva o meio adquire uma coloração acastanhada ao contrário de uma reação negativa onde o meio adquire uma coloração alaranjada.

## 7.9 Principais Produtos Biológicos

Neste subcapítulo serão mencionados alguns dos produtos biológicos analisados no setor da Microbiologia do laboratório AVELAB, bem como os respetivos procedimentos realizados. Serão analisados diversos casos clínicos que tive a oportunidade de participar no processamento. Os resultados obtidos são por este motivo específicos para o agente microbiano em estudo. Os casos clínicos mencionados serão acompanhados por imagens, sempre que possível. De forma a obedecer ao regulamento geral de proteção de dados (RGPD), os nomes dos utentes e os respetivos números mecanográficos não serão mencionados.

### 7.9.1 Urina

A infeção do trato urinário (ITU) é uma das infeções bacterianas mais comuns, constituindo um grave problema para a saúde pública. [14]

Os principais fatores externos responsáveis pelas ITU são: a toma de pilula anticoncepcional, cateterização da bexiga, antibioterapia, gravidez, imunidade comprometida, entre outros.

A incidência das ITU é superior nas mulheres, uma vez que a uretra é anatomicamente mais curta, favorecendo a migração de bactérias provenientes do ânus. Na pré-menopausa, como as mulheres possuem um pH vaginal ácido e uma elevada concentração de lactobacilos na vagina, o risco de contrair ITU é menor. [15]

Os homens como possuem uma uretra com comprimento superior ao da mulher e libertam secreções prostáticas com poder bactericida são menos suscetíveis a contrair infeções urinárias. [16]

A presença de ácidos orgânicos, de níveis elevados de ureia, pH inferior a 5 e micção frequente diminui substancialmente o risco de contrair infecções urinárias. [15] As ITU podem ocorrer ao nível do trato urinário inferior, sendo a cistite a mais comum. Os sintomas mais frequentes de uma cistite são disúria, polaciúria, hematória, vontade contínua de urinar e sensação de ardor durante a micção.

A pielonefrite é por sua vez a infecção do trato urinário superior mais comum, que afeta o rim com envolvimento do parênquima renal. Os sintomas mais comuns de uma pielonefrite são, febre elevada, dores na zona renal, disúria e polaciúria.

A *Escherichia coli*, a *Staphylococcus* coagulase negativa, as Enterobactérias (Ex: *Proteus* spp., a *Klebsiella* spp., o *Staphylococcus aureus* e a *Candida albicans* (em doentes com diabetes mellitus) são os microrganismos mais comuns responsáveis por infecções urinárias. [14]

## **Colheita**

A colheita de urina é realizada maioritariamente pelo utente através da técnica do jato intermédio de urina. Para evitar contaminações com as bactérias da flora vaginal e uretral o laboratório Avelab definiu critérios específicos para a colheita e transporte de urinas. As urinas serão rejeitadas na ausência de refrigeração num período de 2 horas após a colheita, urinas vertidas, sem número mecanográfico, sem volume mínimo (necessário 10 ml para adultos e 5 ml para crianças), que não se encontrem em recipientes esterilizados e urinas obtidas em sacos coletores em utentes algaliados em vez de urinas obtidas por aspiração suprapúbica.

Uma má colheita pode levar a que na urocultura apareçam três ou mais microrganismos e nestes casos o resultado não tem qualquer significado clínico porque estamos perante uma flora polimicrobiana. Deste modo, é crucial que o profissional de saúde tenha em atenção o método de colheita e a informação clínica fornecida pelo utente para que se possa fazer a distinção entre uma infecção e uma contaminação.

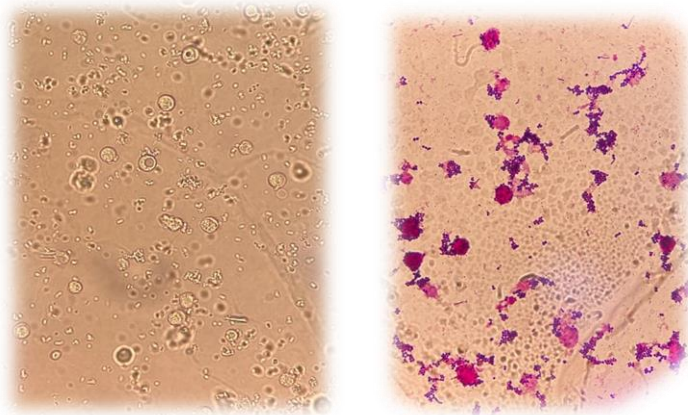
## **Caso Clínico**

Como referido anteriormente, caso seja requerido pelo médico a urocultura e a sumária de urina, esta é analisada primeiramente no aparelho Aution Max Ax-4030. Se não houver alteração de nenhum parâmetro sugestivo de infecção urinária o resultado é dado como negativo. Se o equipamento detetar um ou vários parâmetros alterados estamos perante uma possível infecção urinária e neste caso a amostra é centrifugada durante 10 minutos a 20 rpm para a visualização do sedimento urinário ao microscópio.

Durante o estágio curricular tive a oportunidade de observar e participar no processamento de várias amostras. Um dos casos pertencia a um individuo do sexo feminino cujo clínico requeria um exame bacteriológico de urina. A amostra foi primeiramente triada

para dar entrada no sistema Apollo e de seguida foi centrifugada para a observação do sedimento urinário ao microscópio.

Na ampliação de 100x observaram-se 5-10 células epiteliais e numa ampliação de 400x observaram-se 25-50 leucócitos, 5-10 eritrócitos por campo e cocos em cacho (Imagem I). De seguida foi realizada uma coloração de Gram onde se observaram cocos Gram positivos agrupados em estafilococos, células epiteliais e leucócitos (Imagem I). Não foram observados parasitas, cristais ou fungos.



**Imagem I:** À esquerda, observação do sedimento urinário a fresco: leucócitos, eritrócitos e cocos agrupados em estafilococos (ampliação de 400x). À direita, coloração de Gram: cocos em cacho, leucócitos e células epiteliais de transição (ampliação 100x)

Posteriormente, a urina foi semeada com o auxílio de uma ansa de 1-10 ul, em meio de cultura CHROMagar Orientation e em gelose de sangue. Os meios de cultura foram incubados a 36°C durante 24 h. No fim do período de incubação procedeu-se à observação e análise dos meios de cultura.

### Interpretação dos resultados

Em meio de cultura CHROMagar Orientation, observaram-se colónias pequenas, brancas, lisas e brilhantes. Na gelose de sangue observaram-se colónias brancas, cremosas e  $\beta$ -hemolíticas (a bactéria possui hemolisinas que lisam os glóbulos vermelhos da gelose). De acordo com toda a informação reunida, deduziu-se ser uma infeção por *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria é um coco Gram positivo, que pode formar vários tipos de



**Imagem II-** Colónias brancas acinzentadas no meio de cultura CHROMagar Orientation (esquerda). Colónias brancas em gelose de sangue (direita)

agrupamentos, neste caso específico em estafilococos. Não formam esporos e não apresentam mobilidade.

De forma a corroborar as características acima indicadas, foi realizado o teste da coagulase. O resultado obtido foi de acordo com o esperado (positivo), o que torna este teste uma importante ferramenta de auxílio para o diagnóstico.

A *Escherichia coli* e o *Staphylococcus saprophyticus* são frequentemente responsáveis por causar infecções urinárias, contudo o *Staphylococcus aureus* pode surgir devido a lesões superficiais, fômites e penetração na pele com diferentes objetos (ex: cirurgias, dispositivos médicos como catéteres e drenos).

As culturas obtidas (Imagem II) são consideradas positivas uma vez que têm um microrganismo com mais de  $10^5$  UFC/ ml. Todas estas informações são anotadas no processo da utente para que não haja perda de informação durante o processamento da amostra.

Por último, preparou-se um painel (Tabela II) para a identificação automatizada do microrganismo em estudo. O Phoenix confirmou a identificação realizada pelos técnicos e determinou a suscetibilidades e resistências aos diferentes antibióticos.

### **7.9.2 Fezes**

O trato gastrointestinal Humano é colonizado por uma diversidade de microrganismos da família Enterobacteriaceae (bacilos Gram negativos). Determinadas espécies como a *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. e *Serratia* spp. não fazem parte da flora intestinal, constituindo agentes patológicos. A *Escherichia coli* apesar de colonizar o intestino humano, algumas das suas estirpes (*E. coli* enterotoxigénica) são nocivas para o hospedeiro. A infeção por parte destas bactérias patogénicas ocorre através da ingestão de alimentos e águas contaminadas.

As gastroenterites podem ser parasitárias, fúngicas e virais, no entanto, são maioritariamente bacterianas. Por este motivo é essencial a realização de exames micológicos, parasitológicos e coproculturas em amostras de fezes, para identificar o agente responsável pela infeção e para direcionar a terapêutica através do teste de sensibilidade aos antibióticos.

### **Colheita**

Para a colheita o utente deve defecar para um recipiente limpo, seco e recolher uma pequena porção de fezes para um frasco estéril. Caso seja pedido pelo médico mais do que uma amostra, estas devem ser colhidas em dias diferentes. O frasco deve ser hermeticamente fechado e entregue no laboratório para ser processado. Caso não seja possível a entrega imediata, o utente deve conservar as fezes entre 2° a 8°C até 24 horas.

## Casos Clínicos

Caso Clínico I: Durante o estágio tive a oportunidade de participar no processamento de uma amostra que requeria um exame bacteriológico de fezes (uma amostra). A amostra pertencia a um indivíduo do sexo masculino de 54 anos. No exame macroscópico a amostra possuía uma cor acinzentada, consistência pastosa, cheiro fecóide normal e ausência aparente de sangue e muco. O exame microscópico revelou a presença de raros eritrócitos. Este exame é fundamental na área da microbiologia porque permite detetar a presença de leucócitos, eritrócitos e outros elementos celulares como parasitas e fungos leveduriformes.

De seguida, com o auxílio de uma ansa a amostra foi semeada em caldo selenito, em meio Salmonella-Shigella agar (meio SS) e incubada a 36°C durante 18-24h para a observação do crescimento bacteriano. No fim do período de incubação observaram-se colónias incolores com centro negro (Imagem III). Os resultados obtidos até esta fase são anotados no processo do utente para que não haja perda de informação clínica durante o processamento da amostra. De seguida, a amostra semeada anteriormente no caldo selenito foi repicada para um novo meio SS. As placas (dois mesmos SS) foram colocadas novamente em estufa. Ao fim de 24h foram observadas novamente as características de ambas as uroculturas na qual não foram detetadas alterações nos resultados.

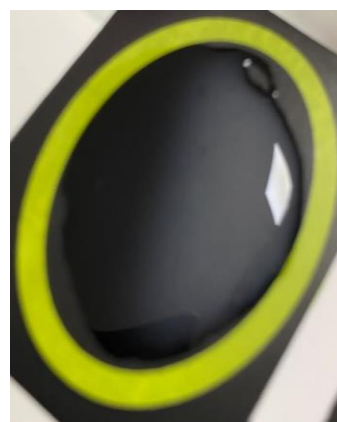


**Imagem III-** Colónias bacterianas incolores com centro negro em meio SS

## Interpretação dos resultados

Em Salmonella-Shigella agar observaram-se colónias incolores com centro negro sugestivo de *Proteus* spp. ou *Salmonella* spp. Ambas as espécies formam colónias incolores uma vez que não fermentam a lactose e são ambas produtoras de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S). As espécies fermentadoras da lactose provocam a acidificação do meio produzindo colónias vermelhas na presença do indicador vermelho neutro.

De forma a distinguir a *Salmonella* spp. do *Proteus* spp. realizou-se o teste da aglutinação, que consiste em partículas de látex revestidas com anti-soros, contra uma ampla gama de antígenos de *Salmonella*.



**Imagem IV-** Teste da aglutinação para a distinção das seguintes espécies: *Salmonella* spp. e *Proteus* spp.



Neste caso clínico não foi observado aglutinação das partículas a olho nú (Imagem IV), o que nos permitiu concluir que a bactéria responsável pela infecção era o *Proteus* spp. Na presença de *Salmonella* spp. haveria a aglutinação das partículas. Apesar de não haver registo fotográfico, o controlo positivo foi também realizado para garantir a segurança dos resultados. Por fim, com o auxílio do painel 409 (Tabela II) procedeu-se à identificação automatizada do microrganismo em estudo e concluiu-se que a bactéria responsável pela infecção era o *Proteus* spp. O BD 100 Phoenix também identificou as sensibilidades e resistências a diferentes antibióticos.

## Caso Clínico 2

Para além do caso clínico mencionado anteriormente, tive a oportunidade de observar o processamento de outras amostras, nomeadamente um exame parasitológico de fezes. Neste caso, a amostra pertencia a um indivíduo de 42 anos do sexo masculino. Foi realizada uma preparação a fresco onde se observou ao microscópio ótico a presença de quistos de *Entamoeba coli*. É um parasita comensal do intestino, que possui uma distribuição mundial. Como podemos observar na Imagem V este quisto possui um diâmetro de 15-25 µm, forma esférica, parede espessa fortemente refringente, oito núcleos, cromatina periférica grossa e irregular, corpos cromatóides em forma de agulha, conteúdo hialino e cariossoma excêntrico.

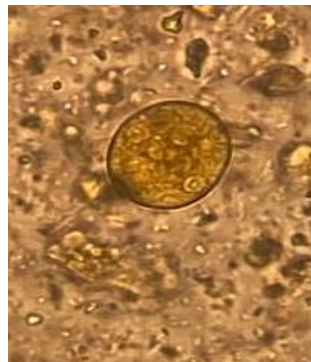


Imagem V-Quisto de *Entamoeba coli*

### 7.9.3 Exsudados Vaginais, Retais e Uretrais

As infeções vaginais e uretrais podem ser provocadas por bactérias, parasitas vírus e fungos. O desequilíbrio da microbiota vaginal pode provocar vaginoses bacterianas. Microbiologicamente, a vaginose altera a microbiota (constituída maioritariamente por *Lactobacillus* spp.), por uma microflora mista com *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., entre outros.

Os exames BPM são realizados em exsudados vaginais e têm como principal objetivo o diagnóstico de vaginites. Esta patologia pode ser provocada por *Trichomonas vaginalis* (parasita), *Candida albicans* (fungo) ou *Gardnerella vaginalis* (bactéria). Para além destes microrganismos, são avaliadas outras bactérias como cocos Gram positivo e bacilos Gram

negativo. Neste subcapítulo serão abordados alguns casos clínicos que foram processados e analisados durante o meu estágio curricular. Os exsudados vaginorretais são realizados maioritariamente em grávidas para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, agente etiológico mais frequente de infeções neonatais.

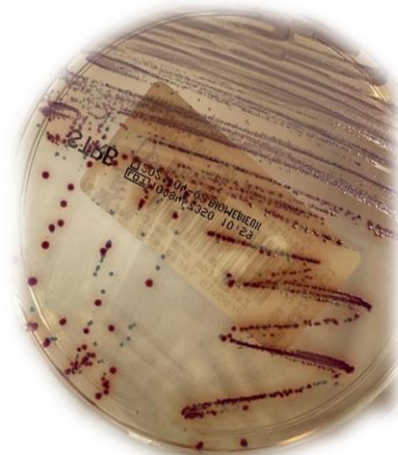
## Colheita

A colheita de um exsudado vaginal é realizada por um profissional de saúde ou técnico de análises clínicas. A realização deste procedimento requer que a utente realize a higiene da região perianal e vulvovaginal com água e sabão. A colheita do exsudado vaginoretal é semelhante à colheita do exsudado vaginal, à exceção que a zaragatoa é introduzida na vagina e no reto e colocada num meio de conservação próprio e estéril.

## Casos Clínicos

**Caso Clínico I:** Durante o estágio tive a oportunidade de participar no processamento de uma amostra vaginorretal cuja credencial médica requeria a pesquisa de *Streptococcus* do grupo B mais especificamente, *Streptococcus agalactiae*. A amostra pertencia a um indivíduo de 32 anos do sexo feminino.

Em primeiro lugar a amostra foi inoculada em caldo TODD que é um meio de enriquecimento para *Streptococcus* do grupo B. O caldo contém antibióticos que inibem o crescimento de bactérias Gram negativas e favorecem o crescimento de *S. agalactiae*, caso este esteja presente na amostra a processar. O caldo foi de seguida incubado numa estufa durante 24h a 36°C. No fim do período de incubação, o caldo TODD foi repicado para o meio de cultura chromID Strep B e colocado novamente em estufa (mais 24h). No fim do período de incubação foram observadas raras colónias cor-de-rosa e inúmeras colónias azuis. Por este motivo foi necessário incubar o meio de cultura por mais 24h para permitir o crescimento de abundantes colónias cor-de-rosa como se pode observar na Imagem VI.



**Imagem VI-** Numerosas colónias cor-de-rosa em meio chromID StreptoB (após incubação de 48h).

## Interpretação dos resultados

Na Imagem VI podemos observar abundantes colónias cor-de-rosa escuro, com formato arredondado e de pequenas dimensões, sugestivo de *Streptococcus agalactiae*. O diagnóstico desta bactéria pode ser feito com base em apenas uma colónia. No entanto para

termos um diagnóstico preciso e definitivo prolonga-se o período de incubação. Contudo se ao fim de 48h apenas crescerem colônias azuis o resultado é dado como negativo para *Streptococcus agalactiae*

O diagnóstico precoce desta bactéria é importante para prevenir a transmissão a recém-nascidos. Esta bactéria é um coco Gram positivo e pode formar agrupamentos em cadeia. Possui um metabolismo anaeróbio facultativo e provas (catálase e oxidase) negativas. Para além de colonizar a região vaginal e bexiga pode ainda localizar-se no trato gastrointestinal e garganta. [17]

**Caso Clínico 2:** Refere-se a um exame BMP (bacteriológico, micológico e parasitológico) em exsudado vaginal. A amostra pertence a um indivíduo de 36 anos do sexo feminino. Em primeiro lugar foi observado ao microscópio ótico uma preparação a fresco, na qual não foram observados parasitas nem fungos, apenas alguns leucócitos e células epiteliais de descamação (numerosas clue cells).

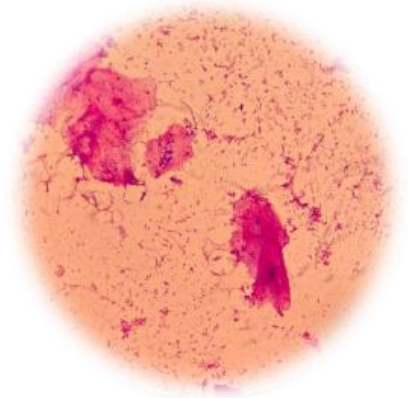
De seguida foi realizado uma coloração de Gram onde foram observados numerosos cocobacilos Gram negativo. Não foram observados bacilos de döderlein nem fungos. (Imagem VII).

Na presença de bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos era imprescindível realizar o exame cultural uma vez que são microrganismos com morfologia relevante. Como neste caso clínico só foram observados cocobacilos Gram negativos não foi realizado o exame cultural.

Caso tivessem sido observados fungos filamentosos e leveduras realizar-se-ia o exame cultural em meio Saboraud. Em gelose de chocolate PVX caso tivessem sido observados diplococos.

### Interpretação dos resultados

A presença de células epiteliais de descamação em clue cells (células epiteliais da vagina com bastonetes Gram negativos aderentes, com aparência difusa quando observados ao microscópio ótico) é indicativo de uma vaginose bacteriana. Adicionalmente a presença de leucócitos e raros lactobacilos sugerem uma infeção provocada pela *Gardnerella vaginalis* A ausência de parasitas e de fungos corroboram também o diagnóstico presuntivo.



**Imagem VII-** Coloração de Gram de um BMP vaginal

#### **7.9.4 Exsudados Nasofaríngeos**

No setor da Microbiologia do laboratório Avelab são apenas realizados dois ensaios clínicos em exsudados faríngeos e nasais, nomeadamente a pesquisa de *Staphylococcus aureus* em amostras da orofaringe e a pesquisa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em amostras nasais.

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogénica oportunista clinicamente relevante, uma vez que tem a capacidade de originar infeções sistémicas graves ou infeções cutâneas superficiais. [18] Para estabelecer uma infeção, o *S. aureus* expressa um conjunto de fatores de virulência específicos como, toxinas (toxinas citolíticas, enterotoxinas), enzimas, adesinas, proteínas de superfície que permitem a sobrevivência das bactérias em condições adversas, entre outros. [19] Durante a infeção são libertadas diversas enzimas como a protease, lipase e elastase que penetram os tecidos e destroem-nos. A interação do sistema imunológico do hospedeiro com as vias da coagulação pode também levar a um choque séptico. [20]

Um dos maiores problemas da saúde pública e em particular em ambiente hospitalar é a resistência das bactérias aos antibióticos, nomeadamente do *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). As infeções por MRSA tornaram-se endémicas em hospitais e em unidades de cuidados intensivos levando ao aumento da mortalidade e morbilidade. [21, 22]

Num individuo saudável, o MRSA não tem impacto a não ser quando existe algum comprometimento das barreiras físicas (como corte na pele). Nos individuos hospitalizados, como o sistema imunitário é mais debilitado, tornam-se mais suscetíveis a infeções por MRSA.

O gene *mecA* é responsável pela resistência à meticilina uma vez que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP2A) com baixa afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos. [20]

A maioria dos exsudados nasofaríngeos rececionados no laboratório Avelab provêm de doentes institucionalizados em cuidados continuados, lares ou doentes acamados com uma faixa etária entre os 70-90 anos.

#### **Colheita**

A colheita do exsudado nasal deve ser realizada por um profissional de saúde especializado. A zaragatoa é inserida no orifício nasal e de seguida são realizados movimentos circulares para recolher o máximo de amostra possível. A zaragatoa é por fim colocada em meio de transporte Stuart. O processamento deve ser realizado de imediato, mas caso não seja possível a amostra deve ser refrigerada por um período máximo de 8 horas entre 2° a 8°C.

## Caso Clínico: Pesquisa de *Staphylococcus aureus* Meticilina-resistente (MRSA)

Um dos casos clínicos em que participei no processamento, pertencia a um indivíduo do sexo masculino de 54 anos. Em primeiro lugar com o auxílio de uma ansa esterilizada inoculou-se o exsudado nasofaríngeo em meio de cultura chromID MRSA SMART. De seguida foi incubado numa estufa durante 24h a 36°C. Após o período de incubação observaram-se abundantes colónias cor-de-rosa e raras colónias brancas (Imagem VIII). Para auxiliar no diagnóstico realizou-se um teste bioquímico complementar, o teste da coagulase.



**Imagem VIII-** Meio de cultura chromID MRSA SMART-Colónias cor-de-rosa

### Interpretação dos resultados

No meio chromID MRSA SMART foram observadas inúmeras colónias cor-de-rosa sugestivas de *Staphylococcus aureus*. O teste da coagulase é realizado para distinguir o *Staphylococcus aureus* (coagulase positivo) do *Staphylococcus saprophyticus* (coagulase negativo). Neste caso clínico, o teste da coagulase apresentou um resultado positivo. Deste modo, foi possível concluir que a bactéria responsável pela infeção foi o *Staphylococcus aureus*. A presença de colónias cor-de-rosa em meio chromID MRSA SMART indicou a resistência à meticilina

### 7.9.5 Expetoração

As infeções do trato respiratório inferior são uma das principais causas de morte tanto em crianças como em adultos. As bactérias e os vírus invadem as mucosas e replicam-se pelo trato respiratório inferior, podendo originar inflamações e patologias graves. [23] No laboratório Avelab é realizado em amostras de espetoração apenas dois procedimentos. O primeiro procedimento, o exame direto e cultural tem como objetivo diagnosticar laboratorialmente infeções do trato respiratório inferior como bronquites ou pneumonias. [24] O exame cultural permite identificar o agente etiológico e determinar o respetivo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. O segundo procedimento, descontaminação e fluidificação de amostras biológicas e exame cultural de micobactérias, tem como objetivo a pesquisa de bacilos Álcool-Ácido-Resistentes (BAAR).

*Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose e a transmissão ocorre pela inalação de aerossóis contaminados. No ser humano o *M. tuberculosis* encontra-se dentro e entre as células do sistema imunitário, que podem conter ou erradicar a maioria das outras

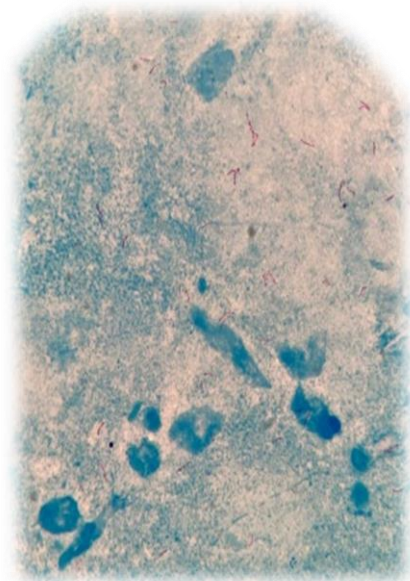
bactérias. [25] De seguida irá ser apresentado um caso clínico de uma baciloscopia para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*.

### Colheita

Para a pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes é necessário que o utente bocheche a boca com água. De seguida é pedido para desencadear golpes de tosse profunda para mobilizar as secreções respiratórias para 3 recipientes estéreis. A colheita deve ser realizada preferencialmente de manhã e em jejum. Todas estas etapas são fundamentais de modo a evitar contaminações com a flora do trato respiratório superior. Caso não seja possível processar a amostra de imediato, esta deve ser refrigerada entre 2 a 8°C num período máximo de 24 horas.

### Caso Clínico

No estágio tive a oportunidade de observar uma baciloscopia para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*. Todo o processamento da amostra foi realizado seguindo todas as regras de segurança. Em primeiro lugar com o auxílio de uma ansa ou zaragatoa, colheu-se a porção mais purulenta da amostra para a realização de um esfregaço. Após a secagem à temperatura ambiente, foi realizada a coloração de Ziehl-Neelsen. Para um diagnóstico preciso é necessário a observação de pelo menos 300 campos. O resultado é dado como negativo caso não haja nenhum BAAR no total de campos, e é dado como positivo quando tem pelo menos um BAAR por campo. Foi possível observar ao microscópio ótico bacilos isolados em forma de bastão com tom avermelhado (Imagem IX) em fundo azul.



**Imagem IX-** Bacilos Ácido-Álcool-Resistentes (BAAR) corados de vermelho

### Interpretação dos resultados

No exame direto foram observados ao microscópio ótico raras células epiteliais provenientes da flora do trato respiratório superior que surgiram por arrastamento. Para além disso, na coloração de Ziehl-Neelsen foram observados mais de 30 bacilos (BAAR) por campo.

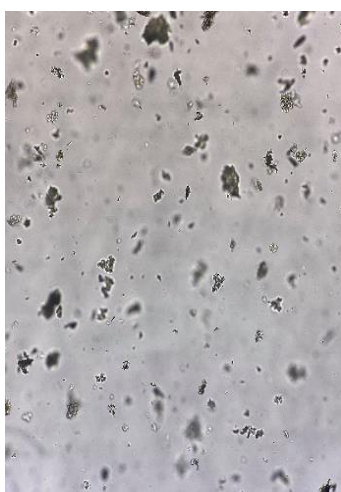
O diagnóstico precoce é fundamental, uma vez que esta bactéria é muito transmissível por via aérea aumentando deste modo o tempo de exposição das pessoas. No laboratório Avelal estes casos clínicos são imediatamente reportados para que desta forma o clínico possa monitorizar o utente.



## 7.10 Serologia Infeciosa

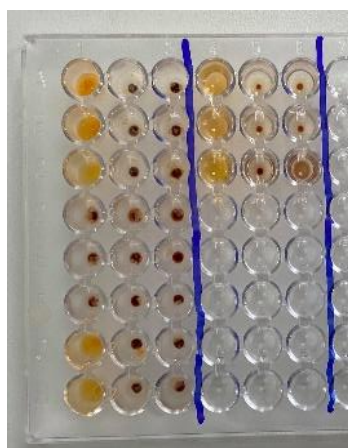
### 7.10.1 TPHA E VDRL

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível cujo agente etiológico é o *Treponema pallidum*. A transmissão ocorre devido ao contacto direto com membranas mucosas, lesões cutâneas ou húmidas. Pode ocorrer ainda transmissão vertical durante a gravidez levando à sífilis congénita. [26]. No laboratório Avelab o diagnóstico é realizado por métodos serológicos que se dividem em testes treponémicos e não-treponémicos.



**Imagem X-** Teste VDRL positivo

Os testes não-treponémicos são inespecíficos e permitem detetar a produção de anticorpos anticardiolipina (IgG e IgM) contra o *Treponema pallidum*. [26] O VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) é um exemplo destes testes, que através de uma amostra serológica, pesquisa reaginas, ou seja, anticorpos produzidos contra a cardiolipina, que é libertada pelas células infetadas por *T. pallidum*. O soro é inoculado com um antigénio composto por solução alcoólica incolor de cardiolipina bovina, colesterol e lecitina. O teste é dado como positivo caso se observe ao microscópio ótico a aglutinação do antigénio (Imagem X). [27]



**Imagem XI-** Teste TPHA positivo e negativo

Os testes treponémicos, nomeadamente o *Treponema pallidum* Hemagglutination Assay (TPHA), é um teste de hemaglutinação usado na deteção de anticorpos *Treponema palladium*. Neste método são utilizados eritrócitos sensibilizados com uma solução antigénica de *T. pallidum*, que aglutinam na presença de anticorpos anti-*T. pallidium*. Na Imagem XI pode-se observar a formação de um padrão no fundo da placa de microtitulação, característico de uma reação positiva. Na ausência de anticorpos, as células não aglutinam e formam um botão compacto no fundo da placa.

O TPHA é um teste mais específico e sensível que o VDRL. O teste TPHA dará sempre positivo, mesmo que o indivíduo tenha contraído a infeção anteriormente e tenha sido tratado com sucesso. Por este motivo, o TPHA não pode ser utilizado na monitorização da terapêutica da sífilis. [28]

### 7.10.2 IgM e IgG anti- *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* é um bacilo Gram negativo, curvo, móvel, não capsulado com prova de oxidase, catalase e urease positiva. Esta bactéria pode ser encontrada em úlceras gástricas e duodenais e no cancro de estômago. A sua deteção pode ser realizada de diversas maneiras, sendo uma delas a pesquisa de anticorpos no soro.

O diagnóstico é habitualmente realizado através do ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), no entanto o teste rápido também é usado na rotina laboratorial devido ao seu baixo custo e praticabilidade. No laboratório Aveab realiza-se apenas a pesquisa da imunoglobulina IgG por lateral flow assay.

### 7.10.3 SARS-CoV-2

A COVID-19 é uma doença respiratória provocada pelo SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus*). O SARS-COV-2 é um vírus envelopado com cápside helicoidal, genoma (+) ssRNA (RNA de cadeia simples de sentido positivo) e pertencente à família *Coronaviridae*.

Em dezembro de 2019, surgiu na cidade de Wuhan, na China um novo coronavírus, designado de SARS-CoV-2. [29] A elevada transmissibilidade permitiu que este se propagasse rapidamente por todo o mundo levando a Organização Mundial de Saúde a declarar uma pandemia mundial. A transmissão da SARS-CoV-2 pode ocorrer diretamente através da disseminação de aerossóis ou indiretamente por contacto direto com superfícies e objetos contaminados ou transmissão feca-oral. [30]

Os sintomas variam muito de pessoa para pessoa sendo os mais comuns febre, tosse, cansaço, perda de paladar e olfato. O SARS-CoV-2 é composto por 4 proteínas principais nomeadamente a proteína do envelope (E), proteína spike (S), proteína da nucleocápside (N) e a glicoproteína da membrana (M). [31]

A glicoproteína de membrana, é a proteína estrutural mais abundante e é responsável pela formação do envelope, a proteína da nucleocápside empacota o RNA, e a proteína estrutural E possui pequenas dimensões e a sua função ainda não é bem compreendida permanecendo ainda em estudo. Por último, a proteína S permite a entrada do vírus dentro das células alvo nomeadamente as células do trato respiratório inferior e superior. [32]

Existe ainda uma proteína designada de hemaglutinina-esterase que facilita o vírus na absorção inicial da membrana celular. Deduz-se que o reservatório natural da SARS.CoV-2 sejam os morcegos do género *Rhinolophus*. [33].



## **SARS-CoV-2 no laboratório Avelab**

No laboratório Avelab realizam-se dois testes para a detecção da SARS-CoV. No método direto realiza-se o PCR em tempo real para a pesquisa de ácidos nucleicos. No método indireto realiza-se o método *lateral flow assay* em amostras de soro, contudo esta metodologia não era realizada no laboratório central, ou seja, as amostras eram enviadas para um laboratório externo.

### **7.11 Validação Médica no setor da Microbiologia**

No fim do processamento das amostras, os resultados são inseridos manualmente em sistema Apollo à exceção dos resultados dos testes da sensibilidade aos antibióticos realizados no aparelho BD 100 Phoenix, uma vez que são transmitidos automaticamente.

Em determinados casos clínicos, após o aparecimento de algum resultado, este é imediatamente reportado ao clínico. Um exemplo destes casos é a capacidade da bactéria *Escherichia coli* produzir b-lactamases. As b-lactamases são enzimas bacterianas que hidrolisam o anel b-lactâmico, impedindo a atividade antimicrobiana. Para além disto a *E. coli* pode adquirir resistência contra os carbapenemos (produz carbapenemases), constituindo uma séria ameaça para a saúde pública. Apresentam a capacidade de se adaptarem ao meio e deste modo criar novas resistências contra os antibióticos.

No laboratório Avelab o aparelho BD 100 Phoenix não consegue detetar a resistência da *E.coli* e de outras bactérias contra os carbapenemos. Deste modo, caso o teste de suscetibilidade antimicrobiana indique que a bactéria é produtora de b-lactamases, os técnicos do setor da microbiologia emitem o resultado como sendo resistente para ambos (b-lactamicos e carbapenemos). Existem outros casos que se deve ter em atenção, nomeadamente a capacidade de resistência da *Pseudomonas spp.* à colistina, levofloxacina, entre outros.

## 8 Imunologia Clínica

A Imunologia é uma disciplina clínica e laboratorial que estuda o sistema imunitário com o objetivo de auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitorização da terapêutica de diversas patologias como o VIH, VHB, VHC, herpesvírus, retrovírus, citomegalovírus, parvovírus, entre outros. O sistema imunitário é composto por diferentes órgãos, células e proteínas que apresentam um papel fundamental na eliminação de células que o organismo reconhece como estranhas. [34] Qualquer substância que induza a sistema imunitário a produzir anticorpos é designada de Antígeno (Ag). A primeira linha de defesa do sistema imunitário contra agentes invasores é constituída por barreiras físicas como a pele, membranas mucosas, células ciliadas e secreções (saliva, suor e urina). A perda de alguma destas barreiras leva o organismo a produzir dois tipos de resposta, inata ou adquirida.

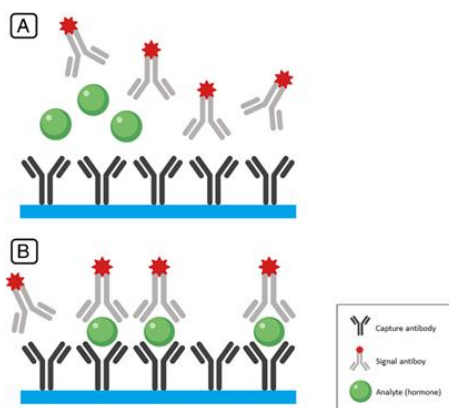
A imunidade inata é o primeiro mecanismo imunológico, não específico, que atua contra determinado agente patogénico. Trata-se de uma resposta imediata e constante, uma vez que não possui “*memória imunológica* “. [34] Deste mecanismo fazem parte células fagocíticas, células “*Natural Killer*”, células dendríticas e o sistema do complemento que induz um conjunto de respostas contra os agentes patogénicos. Por últimos, ocorre a ativação de leucócitos que libertam mediadores inflamatórios, e induzem a última linha de defesa, denominada de imunidade adquirida.

A resposta da imunidade adquirida é mais demorada, levando dias ou semanas a se desenvolver, contudo é mais específica para cada antígeno presente. A “*memória imunológica*” é uma característica da resposta imune adquirida uma vez que após um segundo contacto com o mesmo antígeno, a resposta imunológica será mais rápida, eficaz e específica. A resposta pode ser mediada por linfócitos T, onde os linfócitos T citotóxicos destroem as células-alvo infetadas, e os linfócitos T auxiliares ativam uma resposta humoral que permite que os linfócitos B se diferenciem em plasmócitos e secretem anticorpos contra um antígeno específico. [35]

No laboratório Avelab, o setor da Imunologia realiza diversos ensaios para o estudo de alergias, autoimunidade, endocrinologia, anemia, serologia infecciosa, pesquisa e monitorização de marcadores tumorais, pesquisa de drogas de abuso, entre outros. Neste setor o Architect ci 8200 e o Architect i 1000 plus utilizam como método instrumental de análise, diferentes metodologias como a potenciometria, quimiluminescência e fotometria. No equipamento Phadia 250 são realizados imunoensaios fluorezímicos através de tecnologia ImmunoCAP para a IgE específica e IgE total, e tecnologia EliA para a realização de anti-dsDNA, Anti-ENA, Antitransglutamina-se tecidular IgG e IgA, Anti-Cardiolipina IgG e IgM, entre outros.

## 8.1 Imunoensaio Competitivo

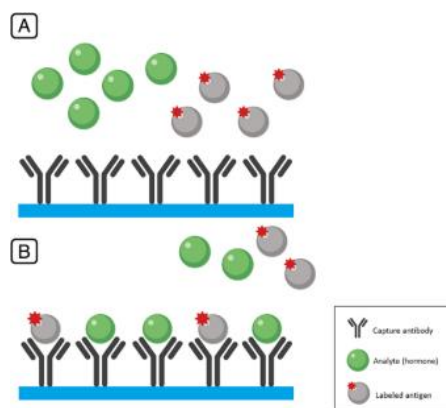
Os imunoensaios competitivos são habitualmente usados quando o antígeno é de pequenas dimensões e possui apenas um determinante antigénico. Ambos os antígenos, o da amostra e o análogo marcado, competem pelos anticorpos que se encontram ligados a uma matriz sólida. (Figura XII). O antígeno marcado e fixo à matriz é incubado com um anticorpo de concentração conhecida e com o antígeno da amostra. Por último quantifica-se o sinal que é inversamente proporcional à quantidade de analito na amostra. Quanto mais antígenos presentes na amostra se ligarem aos anticorpos, menos antígenos marcados irão se ligar aos mesmos. [36]



**Figura XII-** Diagrama ilustrativo de um imunoensaio competitivo  
(<https://clindiabetesendo.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40842-019-0086-7/figures/>)

## 8.2 Imunoensaio não competitivo (Sandwich)

O imunoensaio não competitivo (Sandwich) utiliza dois anticorpos. O anticorpo de captura, que se encontra fixo a uma matriz sólida e é altamente específico para o antígeno, e o anticorpo de deteção que se encontra marcado e liga-se ao antígeno num epítopo diferente do anticorpo de captura. Desta forma, o antígeno específico da amostra é capturado pelo primeiro anticorpo e detetado por um segundo anticorpo marcado com uma enzima que se liga ao analito formando um complexo anticorpo-analito-anticorpo (sandwich) (Figura XIII). A concentração do analito é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo marcado. [36]



**Figura XIII-** Diagrama ilustrativo de um imunoensaio não competitivo (sandwich)  
(<https://clindiabetesendo.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40842-019-0086-7/figures/2>)

## 8.3 Métodos instrumentais de Detecção de Imunocomplexos Antígeno-Anticorpo

### 8.3.1 Quimioluminescência

A quimioluminescência é uma luminescência produzida por reações químicas que induzem a passagem de um elétron do seu estado fundamental para um estado eletrônico excitado. A emissão de quimioluminescência em diferentes comprimentos de onda (desde radiação ultra-violeta até à radiação infravermelha) ocorre quando o elétron desce para um nível de energia inferior. [37]

O estado de excitação é causado por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico, como por exemplo, o luminol, isoluminol, luciferina e o peróxido de hidrogénio. A reação requer a presença de catalisadores como enzimas (fosfatase alcalina), iões metálicos ou por complexos metálicos (como por exemplo o  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ). [38]

A quimioluminescência é um método usado em imunoensaios competitivos e não competitivos (sandwich) para a deteção de proteínas, vírus, nucleótidos e sequências de ácidos nucleicos, a partir de um marcador luminescente ligado a um anticorpo ou antígeno. Na quimioluminescência o anticorpo é marcado com um composto quimioluminescente que emite luz quando combinado com um reagente *trigger* (gatilho), como o luminol, isoluminol e ésteres de acridina. Estes emitem grandes quantidades de luz que é diretamente proporcional à concentração de antígenos presentes na amostra, tornando o método mais sensível.

### 8.3.2 Fotometria

A fotometria é uma técnica que quantifica e mede as propriedades da porção visível do espectro eletromagnético, de acordo com a sensibilidade do olho humano. O espectrofotómetro é um instrumento laboratorial que mede a quantidade de fótons absorvidos (absorvância) quando um feixe de luz monocromático atravessa um meio homogêneo, resultante de reações colorimétricas, enzimáticas e turbidimétricas.

Este método relaciona a quantidade de luz absorvida e a fração de luz transmitida (transmitância) e detetada pelo fotossensores, com a concentração do analito em estudo. [39]

### 8.3.3 Potenciometria

A potenciometria mede a diferença de potencial entre um eléctrodo indicador e um eléctrodo de referência, numa célula eletroquímica na ausência de corrente. O eléctrodo indicador gera uma resposta rápida, reproduzível, mas seletiva, cujo potencial depende da concentração do analito. Por outro lado, o eléctrodo de referência obedece à equação de Nernst e gera uma resposta reversível cujo potencial é independente da concentração do analito presente na solução em estudo. Ambos os eléctrodos encontram-se ligados aos

terminais de um voltímetro de alta impedância. O potencial resultante está diretamente relacionado com a atividade do iao e com sua concentração na solução em análise. [40]

#### 8.4 Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são indicadores bioquímicos produzidos pelas células neoplásicas ou pelos tecidos do hospedeiro em resposta às células tumorais. Podem ser encontrados em tumores, tecidos, sangue, saliva, urina e outros fluidos corporais. A pesquisa dos marcadores tumorais permite auxiliar no diagnóstico e acompanhar a evolução da doença e da terapêutica associada. Contudo devem ser sempre acompanhados de outros exames clínicos devido à sua baixa sensibilidade e especificidade. [41,42]

Apesar de não existir o marcador tumoral ideal devem ser reunidas um conjunto de características que permitam melhorar a sua eficiência, tal como: elevada especificidade para o respetivo tumor, ser detetável num estadio precoce da doença, ser muito sensível para evitar falsos negativos e a sua concentração deve ser proporcional ao volume de massa tumoral em estudo. [43] No laboratório Avelab, os marcadores tumorais são determinados em amostras de soro, plasma e urina 24 horas. No Architect iSystem são analisados apenas alguns marcadores tumorais (Tabela IV). Os restantes são enviados para um laboratório externo uma vez que não existe um volume suficiente de amostras para cobrir os custos dos reagentes.

**Tabela III**-Principais Marcadores tumorais existentes no aparelho Architect iSystem no Laboratório Avelab e respetivos órgãos e patologias associados

<b>Marcador Tumoral</b>	<b>Órgão ou Doença</b>
<b>Antigénio carcinoembrionário</b>	Tiroide, Esófago, Fígado, Vesícula Biliar, Estômago, Pulmão, Útero, Mama, Intestino e Reto
<b>Tiroglobulina</b>	Tiroide
<b>Antigénio carbohidratado 15-3</b>	Mama
<b>Antigénio carbohidratado 19-9</b>	Pâncreas, Fígado, Vesícula Biliar, Intestino e Reto
<b>Antigénio carbohidratado 125</b>	Ovários
<b>Antigénio específico da próstata total e livre</b>	Próstata
<b><math>\alpha</math>-Fetoproteína</b>	Testículos, Fígado e Vesícula Biliar
<b>Desidroepiandrosterona</b>	Rim
<b>Gonadotrofina coriônica humana</b>	Testículos
<b>Ferritina</b>	Fígado
<b>Beta 2 microglobulina</b>	Mieloma Múltiplo e linfomas
<b>Gastrina</b>	Estômago

### 8.4.1 Antígeno Hidrocarbonado 19-9

O antígeno hidrocarbonado 19-9 (CA 19-9) é um complexo glicoproteico da superfície celular com elevado peso molecular. É detetado por um anticorpo monoclonal, o I116-NS-19-9, em soro ou plasma no Architect iSystem. A sua expressão requer o produto do gene Lewis, o 1,4-fucosiltransferase, encontrado apenas em indivíduos com grupos sanguíneos Lewis (6 a 22% da população são Lewis negativo pelo que não produzem o CA 19-9). [44]

Os níveis de CA 19-9 encontram-se elevados no cancro colo-retal, gastrointestinal e ainda em diversas patologias benignas como pancreatites, estase biliar e neoplasias ováricas e broncopulmonares. Uma vez que o CA 19-9 não é utilizado como teste de diagnóstico, é determinado laboratorialmente para monitorizar a resposta do tumor à terapêutica e para avaliar o estadio do tumor. [45]

### 8.4.2 $\alpha$ -Fetoproteína

A  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína produzida pelo fígado e saco vitelino do feto. Após a sua síntese, é libertada para o soro fetal atingindo o pico aproximadamente às 13 semanas de gestação. A concentração de AFP vai diminuindo gradualmente e após o nascimento desce drasticamente. [46]

A AFP cujas propriedades físico químicas assemelham-se à albumina sérica, tem como função o transporte de moléculas como iões de metais pesados, ácidos, bilirrubina, hormonas e medicamentos. Os níveis de AFP no soro, líquido amniótico e urina, permitem despistar algumas patologias como por exemplo anomalias cromossómicas, deficiências congénitas e tumores. [46]

Apresenta ainda um papel fundamental na monitorização do prognóstico de carcinomas hepatocelulares e tumores testiculares, uma vez que este marcador tumoral promove a formação de vasos sanguíneos tumorais, a proliferação de células cancerígenas e a inibição da apoptose dessas mesmas células. [47]

### 8.4.3 Antígeno Hidrocarbonado 15-3

O antígeno hidrocarbonado 15-3 (CA 15-3) é uma glicoproteína com peso molecular de 300-450 kDa que deteta formas solúveis da proteína MUC-1. O CA 15-3 é expresso nas membranas plasmáticas apicais dos tecidos epiteliais secretores, e tem a capacidade de detetar através de imunoensaios não competitivos (sandwich) dois anticorpos monoclonais, I15D8 e DF3. Enquanto o anticorpo DF3 atua contra uma fração enriquecida da membrana do cancro da mama, o anticorpo I15D8 atua contra a membrana da globulina da gordura do leite materno. [48]

O marcador tumoral CA 15-3 encontra-se elevado na maioria dos indivíduos com cancro de mama, contudo também se encontra elevado em tumores pancreáticos, ováricos, gástricos e pulmonares. Por este motivo não é um marcador específico do cancro de mama, mas é imprescindível na deteção de metástases e na monitorização da terapêutica e do pós-operatório. [48]

#### **8.4.4 Antígeno Carbohidratado 125**

O antígeno carbohidratado 125 (CA 125) é uma glicoproteína mucínica, produzida pelo gene MUC 16 e expressa no epitélio celómico fetal e seus derivados (ducto de Müller, trompas de falópio, endométrio, pleura, pericárdio, entre outros). [49,50]

O marcador tumoral CA 125 desempenha um papel importante no diagnóstico e na avaliação da progressão e eficácia da terapêutica contra o carcinoma do ovário. Contudo são também observados níveis elevados de CA 125 em tumores endometriais, pancreáticos, pulmonares, colorretais e em tumores gastrointestinais. [51]

Algumas condições fisiológicas como menstruação, o período pós-parto, endometriose pélvica e primeiro trimestre de gravidez, levam ao aumento da concentração deste biomarcador. O marcador tumoral CA 125 é essencial para avaliar a presença de massas pélvicas em mulheres na pós-menopausa, bem como monitorizar a recorrência dessas malignidades. Por este motivo tornou-se fundamental o acompanhamento das mulheres na área da Ginecologia e Oncológica. [51,52]

#### **8.4.5 Antígeno Carcinoembrionário**

O antígeno Carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína com baixo peso molecular (1800-200 KDa), descrito pela primeira vez em 1965 por Gold e Freedman. É produzido pelas células da mucosa gastrointestinal durante o desenvolvimento fetal, contudo após o nascimento ocorre uma diminuição significativa da sua produção. [53]

O antígeno CEA encontra-se elevado em diversos tumores malignos entre os quais, mama, pulmão, tireoide, estômago e pâncreas. Por outro lado, em patologias benignas encontra-se elevado em casos de insuficiência renal, hipotireoidismo e cirrose hepática. [54]

O CEA não é um marcador específico do cancro e por este motivo deve ser complementado com outros biomarcadores nomeadamente, o CA 19-9, o CA 125 e o CA 50, de forma a aumentar a precisão do diagnóstico. O CEA é um marcador determinado laboratorialmente uma vez que permite monitorizar a terapêutica, o estadió do tumor e a presença de metástases. [45]

#### **8.4.6 Tiroglobulina**

A tiroglobulina é uma glicoproteína sintetizada pelas células foliculares da tireoide. Encontra-se armazenada como colóide no interior dos folículos tiroidianos e desempenha um papel crucial na síntese da tiroxina (T4) e da triiodotironina (T3). [55] Todo o processo é regulado pela hormona tiroestimulante (TSH) produzida pela hipófise.

A concentração de tiroglobulina no soro reflete 3 fatores: a massa de tecido tiroideu diferenciado, a magnitude do estímulo do recetor da tirotropina, e lesões físicas e inflamações da tireoide [56] A tiroglobulina é o marcador tumoral mais utilizado no estudo do cancro diferenciado da tireoide.

O doseamento da tiroglobulina é realizado em conjunto com os anticorpos antitiroglobulina uma vez que estes podem levar a resultados falsos negativos nos ensaios imunométricos. [55]

Um dos procedimentos cirúrgicos mais realizados contra o cancro diferenciado da tireoide é a tireoidectomia. Uma das vantagens deste procedimento é a ablação do tecido remanescente após terapia adjuvante com iodo radiativo, permitindo deste modo reduzir o risco de recorrência e o aumento da mortalidade. [57]

#### **8.4.7 Antígeno Específico da Próstata**

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma serino-protease produzida pelo epitélio colunar do tecido prostático. O PSA passa pelas células da camada basal, músculo liso, fibroblasto, células epiteliais e membranas capilares até entrar na circulação sistémica. [58]

Estudos recentes, demonstraram que o PSA encontra-se no sangue sob diferentes formas enzimáticas. Em condições normais é sintetizado na forma de um precursor, o proPSA, no retículo endoplasmático rugoso das células epiteliais da próstata. Após a sua formação é secretado por exocitose no lúmen dos ductos prostáticos. [45]

O marcador PSA apesar de ser específico da próstata não pode ser utilizado no diagnóstico do cancro prostático devido à sua baixa especificidade. O seu principal objetivo é a monitorização da doença, da terapêutica e de possíveis recidivas. Para auxiliar no diagnóstico são realizados exames complementares como o exame retal digital (DRE) e a ultrassonografia prostática transretal. [58]



#### **8.4.8 Gonadotrofina Coriônica Humana**

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma glicoproteína produzida essencialmente pelos sinciotrofoblastos diferenciados, fundamentais para a manutenção de uma gravidez. Durante as primeiras 6 semanas de gravidez a hCG estimula a secreção de progesterona e estradiol pelas células do corpo lúteo fundamentais para o endométrio. A placenta no decorrer da gravidez assume a produção destas hormonas. Para além disto a hCG estimula o crescimento fetal, a organogénese e a diferenciação do cordão umbilical. [59]

A hCG é composta por duas subunidades, a alfa e a beta, que se encontram ligadas por cadeias laterais hidrocarbonadas. A especificidade da subunidade beta permite determinar os níveis de hCG sem ocorrerem reações cruzadas com outras hormonas. [45] A hCG total pode estar aumentada em neoplasias da próstata, ovário, pulmão, mama, reto e em tumores trofoblásticos. [60]

Na presença de tumores germinativos do testículo, a hCG é doseada em conjunto com a  $\alpha$ -fetoproteína e a lactato desidrogenase (LDH). A LDH está presente em todas as células do corpo e é libertada após a morte celular. Os níveis de AFP estão associados à presença de metástase e persistência do cancro dos testículos. [61]

Os níveis de hCG encontram-se elevados em 40-50% dos homens com tumores não-seminomatosos do testículo e é indicativo de um mau prognóstico. Na glândula pituitária, fígado, colón, próstata, testículos e mama também podem ser detetadas pequenas quantidades de hCG. [62]

#### **8.5 Vírus da Imunodeficiência Humana**

O Vírus da imunodeficiência Humana mais conhecido como HIV é um vírus do género *Lentivirus* pertencente à família *Retroviridae*. É um vírus envelopado, esférico, com cápside em forma de cone truncado. Possui um genoma de RNA de cadeia simples com polaridade positiva com um intermediário de DNA de cadeia dupla. O HIV teve origem em vírus símios que ultrapassaram a barreira da espécie e levaram ao aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida foi identificado pela primeira vez em 1981 em São Francisco na Califórnia, levando à morte de inúmeros jovens homossexuais, hemofílicos e toxicodependentes. Em 1983, o HIV foi isolado pelo grupo de Luc Montagnier. Segundo os investigadores, as primeiras infeções surgiram em África, mas acabaram por se espalhar por todo o mundo devido às migrações. O HIV constitui um grave problema de saúde pública, estimando-se que existam atualmente 38 milhões de pessoas infetadas. [63]

O vírus da Imunodeficiência Humana divide-se em dois tipos, nomeadamente o HIV-1 e o HIV-2 que possuem 50% de homologia genómica. As partículas virais estão presentes em fluidos biológicos infetados (sangue, sémen, secreções vaginais) e podem ser transmitidos através de relações sexuais desprotegidas, partilha de seringas, transfusões sanguíneas e por transmissão vertical (gravidez, parto ou aleitamento).

O HIV apresenta tropismo celular para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (auxiliares), para os monócitos, macrófagos e para as células dendríticas. A proteína do envelope viral (gp120) liga-se ao recetor CD4 (presente nos linfócitos T auxiliares, monócitos e macrófagos) e de seguida a um co-receptor (CCR5, CXCR4), permitindo a fusão do envelope viral com a membrana celular. Após a fusão ocorre a libertação do genoma viral no citoplasma da célula-alvo na qual a transcriptase reversa sintetiza uma dupla cadeia de DNA usando como molde o RNA viral. A transcriptase reversa possui uma elevada taxa de erros, inserindo mutações em regiões não específicas dos genes.

Esta característica associada à intensa replicação viral torna o HIV suscetível a mutações diárias, em particular no gene que codifica a proteína do envelope (gp120). A presença de populações geneticamente heterogéneas (quasiespécies) num indivíduo infetado leva o sistema imunitário a criar constantemente novas respostas adaptativas.

O HIV para além de incorporar o seu genoma no da célula infetada, pode estabelecer infeções latentes em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que constituem reservatórios virais permanentes nos nódulos linfáticos. Isto vai permitir que o vírus se replique e dissemine para outros tecidos linfáticos nomeadamente o tecido linfático associado ao intestino onde se encontram a maioria dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória. [64]

Após a exposição ao vírus surge uma infeção aguda, que dura cerca de 2 a 6 semanas e onde os níveis de RNA viral plasmático aumentam substancialmente disseminando-se por todo o organismo. O perigo de contágio nesta fase é elevado e ocorre uma queda do número de linfócitos T CD4. Para além disso, ocorre o aparecimento de sintomas semelhantes a um quadro gripal. O desenvolvimento da resposta imune induz um aumento do número de linfócitos T CD8 reativos que eliminam células infetadas. Ocorre também a produção de anticorpos, que contribuem para a diminuição do número de partículas virais na corrente sanguínea, aumentando novamente o número de linfócitos T CD4. Nesta fase o indivíduo entra no período de latência clínica, na qual não apresenta sintomatologia inerente à replicação viral.

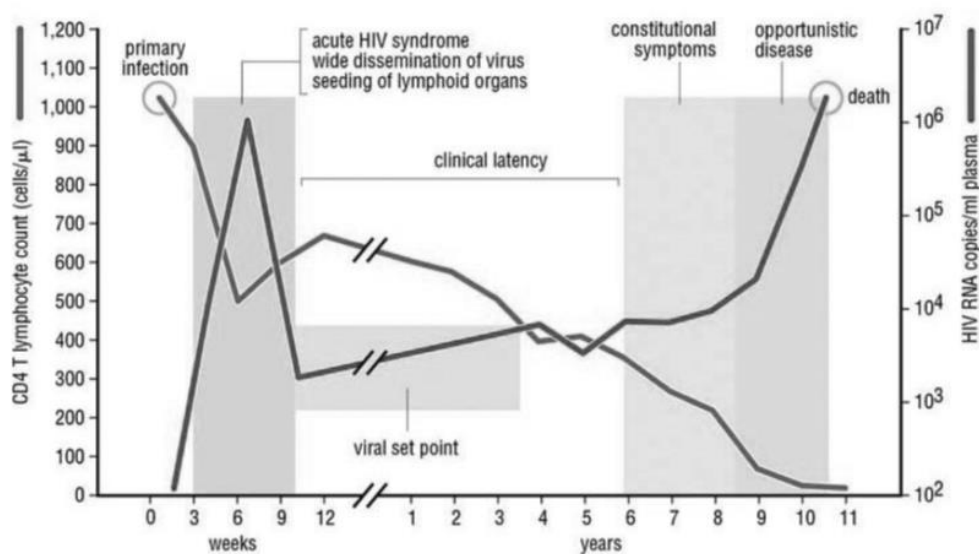
É uma fase de latência clínica não vírica, uma vez que a destruição das células T CD4 implica a destruição das células do sistema imunitário, aumentando o risco de infeções

oportunistas. A duração desta fase depende da relação entre a carga viral e do número de linfócitos T CD4.

A diminuição gradual do número de linfócitos T CD4+ durante a fase de latência clínica faz com que o indivíduo entre na fase de SIDA. Na ausência de tratamento, este quadro clínico desenvolve-se após 8 a 10 anos de um período assintomático.

A diminuição da resposta do sistema imunitário leva ao aumento da replicação viral tornando os indivíduos imunodeprimidos mais suscetíveis a infeções oportunistas e neoplasias como o sarcoma de Kaposi, o linfoma não Hodgkin ou cancro do colo do útero no caso das mulheres. Para além disto, podem ocorrer complicações neurológicas associadas à infeção por HIV. [65]

Os critérios que definem se um indivíduo se encontra ou não na fase de SIDA são: a presença de anticorpos anti-HIV no plasma, uma contagem de linfócitos T CD4 inferior a 200 linfócito/ $\mu\text{L}$  de sangue ou uma contagem de linfócitos CD4 inferior a 14% do total de linfócitos presentes no sangue. Na Figura III encontra-se ilustrado o curso de uma infeção pelo HIV.



**Figura III-** Curso de uma infeção pelo HIV na ausência de tratamento ([https://www.researchgate.net/figure/Figura-I-Curso-da-infeccao-pelo-HIV-adaptado-de-Costin-JM-Cytopathic-Mechanisms\\_fig1\\_335260523](https://www.researchgate.net/figure/Figura-I-Curso-da-infeccao-pelo-HIV-adaptado-de-Costin-JM-Cytopathic-Mechanisms_fig1_335260523))

O curso de uma infeção por HIV em crianças (transmissão vertical) é mais rápido que nos adultos. Na ausência de terapia antirretroviral 28% das crianças acabam por falecer antes dos 5 anos de idade. [66]

Para além do sistema imunitário dos recém-nascidos não se encontrar totalmente desenvolvido, possuem um elevado número de linfócitos T CD4+, que os torna mais suscetíveis a infeções por HIV.

No laboratório Médico Avelab realiza-se a pesquisa de anticorpos contra o HIV-1 e HIV-2, através de imunoenaios enzimáticos. Na presença de um resultado reativo para a

pesquisa de anticorpos anti-HIV, o ensaio é repetido em duplicado. Consoante os resultados obtidos, esquematizados na Figura IV, a amostra é enviada para o laboratório da Ambar para a realização de um teste confirmatório por Western blot e para a identificação do tipo de HIV.

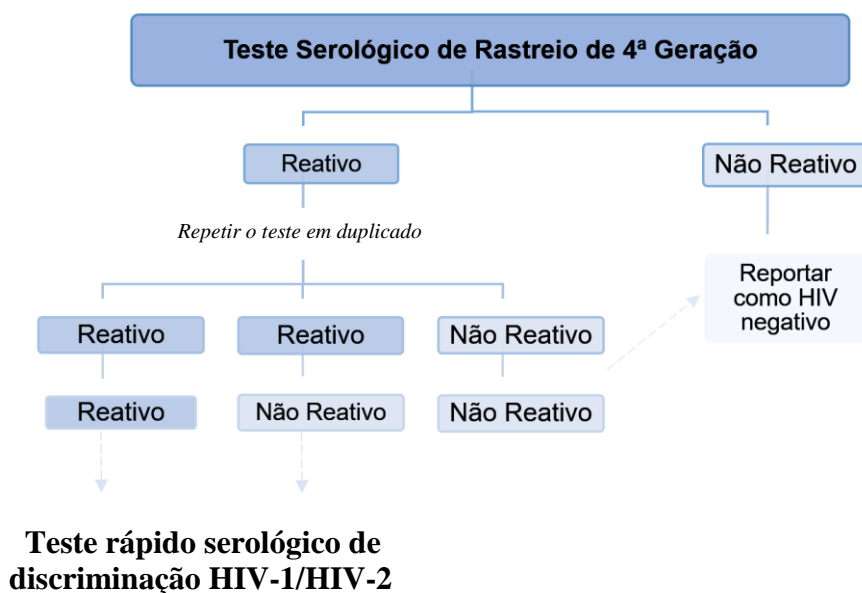


Figura IV-Normas para o diagnóstico laboratorial da infeção por HIV

## 8.6 Rubéola

A rubéola é uma doença provocada pelo vírus da rubéola, pertencente à família *Togaviridae*, e o homem é o único hospedeiro natural conhecido. É um vírus envelopado de RNA de cadeia simples com polaridade positiva, que codifica duas proteínas não estruturais (p90 e p150) e três proteínas estruturais nomeadamente a glicoproteína E1 e E2 e a proteína da cápside (CP). A transmissão ocorre por contacto direto com secreções do trato respiratório de indivíduos infetados. A rubéola afeta de igual forma crianças de ambos os sexos, mas em adultos afeta maioritariamente mulheres. [67]

Este vírus apresenta uma distribuição mundial, mas a sua incidência é maior nos meses da primavera em países de clima temperado. Em mulheres não grávidas é geralmente uma infeção benigna e autolimitada, contudo nas mulheres grávidas pode levar a malformações congénitas e até mesmo à morte do feto. Após invadir as células do hospedeiro por endocitose mediada por um recetor, ocorre replicação viral nas células da nasofaringe. De seguida, o vírus invade outros tecidos nomeadamente o tecido linfoide da nasofaringe e do trato respiratório superior. Este processo é acompanhado pela disseminação do vírus por múltiplos órgãos, 5 a

7 dias após a inoculação. O aumento da carga viral vai deste modo estimular a sistema imunitário a produzir anticorpos. [68,69]

O aparecimento dos primeiros sintomas como erupção cutânea, febres baixas, linfadenopatias e mau estar geral, coincide com a produção de anticorpos, sugerindo que estas manifestações clínicas resultem da resposta do sistema imune.

Nos adultos, em particular nas mulheres, podem ser observados sintomas mais severos como artrite transitória e artralgia. A trombocitopenia e a encefalopatia pós-infeciosa são complicações associadas à rubéola adquirida pós-natal. [68]

A presença de anticorpos IgM durante 6 semanas indicam que a infeção provocada pelo vírus foi adquirida recentemente. Por outro lado, a presença de anticorpos IgG indicam que o individuo já teve contacto com o vírus e possui anticorpos que lhe conferem imunidade para o resto da vida. A infeção materna pode passar por via transplacentária para o feto, levando deste modo ao Síndrome da Rubéola Congénita. O risco de transmissão fetal está dependente do número de semanas gestacionais e da virulência. [69]

Aproximadamente 85% dos recém-nascidos, desenvolvem malformações congénitas caso a infeção materna ocorra nas primeiras 12 semanas de gestação, baixando este valor para 25% se a infeção ocorrer durante a segunda metade do segundo trimestre. [70].

O prognóstico de crianças com Síndrome da Rubéola Congénita varia de acordo com a gravidade e número de órgãos afetados. Em recém-nascidos esta síndrome provoca manifestações clínicas distintas: anomalias transitórias que incluem trombocitopenia, anemia hemolítica, hepatoesplenomegalia e meningoencefalite; anomalias permanentes que incluem oftalmopatias (coriorretinite, glaucoma, retinopatia, microftamia e hipoplasia da íris) e anomalias cardíacas que incluem hipoplasia da artéria pulmonar. Uma vez que as manifestações clínicas da rubéola são inespecíficas, não é possível fazer um diagnóstico clínico, tornando-se fundamental a realização de testes serológicos para confirmar a presença do vírus da rubéola. O diagnóstico é realizado através da pesquisa de anticorpos IgM/IgG específicos (Tabela V) ou da presença de RNA viral. [69]

No período pré-natal a Síndrome da Rubéola Congénita pode ser detetada pelo doseamento da IgM específica no sangue fetal nos primeiros 6 meses de vida, e pela deteção de RNA viral no líquido amniótico ou sangue fetal. No entanto é recomendado a pesquisa de anticorpos contra o vírus da rubéola antes da concepção de modo a serem tomadas medidas profiláticas caso a mulher não esteja imune. [69]

**Tabela IV-** Interpretação dos resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos anti-rubéola

<b>Resultados</b>	<b>Interpretação dos resultados</b>	<b>Medidas recomendadas</b>
<b>IgM- IgG-</b>	Não possui anticorpos contra a rubéola	Medidas profiláticas em mulheres grávidas
<b>IgM+ IgG-</b>	Presença de IgM não específica ou início de uma infecção Após 4 semanas o ensaio deve ser repetido	Após a repetição do ensaio: -Se o valor permanecer constante estamos perante uma IgM não específica -O aumento da IgM e/ou aparecimento de IgG é indicativo de uma primo-infecção.
<b>IgM- IgG+</b>	Valores elevados de IgG indicam a presença de anticorpos contra o Rubéola (imunidade) Valores baixos de IgG indicam que o ensaio deve ser repetido ao fim de 3 semanas	Após a repetição do ensaio: -IgG e IgM constantes são indicativo de uma infecção antiga -Um aumento de quatro vezes ou mais da IgG é indicativo de uma infecção ativa sem IgM -O aumento de anticorpos IgG ou o aparecimento de anticorpos IgM é indicativo de uma reinfeção
<b>IgM+ IgG+</b>	Infeção recente	O ensaio deve ser repetido em soro e plasma para confirmação do resultado

## 8.7 Toxoplasmose

A *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório que infeta um terço da população mundial. Possui vários reservatórios naturais como aves e mamíferos, tendo como hospedeiro definitivo o gato doméstico. [71]

Este parasita apresenta três estágios diferentes durante o seu ciclo de vida: os taquizoítos, que resultam da reprodução assexuada e têm a capacidade de se multiplicar nas células nucleadas dos hospedeiros definitivos e intermediários durante a fase aguda da infecção; os quistos que possuem no seu interior bradizoítos e que se encontram em diferentes órgãos como o cérebro, retina, músculo cardíaco e esquelético e por último os ooquistos que correspondem à forma imatura não infetante e resultam da reprodução sexuada que ocorre no intestino delgado do gato.

Este parasita invade as células epiteliais do intestino delgado do gato, onde ocorre a reprodução sexuada. Da fecundação resulta um ooquisto não esporulado que é eliminado nas fezes do gato. A maturação para ooquisto esporulado infeccioso ocorre no meio ambiente. Dentro do hospedeiro intermediário (o Homem), os ooquistos continuam o seu ciclo de vida

e reproduzem-se assexuadamente. Após a ingestão, o ooquistos libera esporozoítos que penetram no epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos.

Os taquizoítos entram na corrente sanguínea e replicam-se no interior das células nucleadas (macrófagos, linfócitos, granulócitos), o que permite a disseminação do parasita por todo o organismo. [72] Estes taquizoítos observam-se durante a fase aguda da infecção e são responsáveis pelas manifestações clínicas. Posteriormente invadem órgãos e tecidos formando quistos tecidulares que contêm bradizoítos. Estes permanecem em estado de latência ou evoluem para infecção crônica. Os órgãos em que eles se encontram são nomeadamente o cérebro, retina, músculo esquelético e cardíaco. [73]

A transmissão de *Toxoplasma gondii* ocorre através da ingestão de quistos em carne mal cozinhada ou pela ingestão de ooquistos esporulados provenientes das fezes dos felinos contaminados. Pode ocorrer também pela ingestão do parasita em leite contaminado e através do transplante de órgãos ou transfusões sanguíneas. [74]

Nos indivíduos imunocompetentes a maioria dos casos são benignos, auto-limitados e assintomáticos. Nos indivíduos imunodeprimidos, a toxoplasmose pode levar à reativação de uma infecção latente previamente adquirida. Nestes casos as manifestações clínicas são mais severas devido à ausência de imunidade específica, provocando quadros de linfadenopatias, meningoencefalite, pneumonite, coriorretinite e miocardite. [75]

A Toxoplasmose Congênita resulta de uma primo-infecção contraída pela mãe durante a gravidez. Com o avançar da gravidez a incidência da infecção aumenta e a gravidade diminui. A contaminação materna durante o 1º ou 2º trimestre da gravidez leva a um quadro agudo com invasão dos órgãos fetais. No 3º trimestre a infecção é normalmente assintomática à nascença, contudo muitos recém-nascidos podem desenvolver a doença à posteriori. A infecção congênita pode levar a alterações oculares como cegueira, estrabismo, coriorretinite e a alterações neurológicas como calcificações intracranianas, atraso mental e psicomotor. Por outro lado, o tratamento precoce da mulher diminui o risco de transmissão fetal e reduz a gravidade de lesões fetais. As grávidas que possuem uma infecção crônica não contaminam o feto durante o desenvolvimento intra-uterino. [72]

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose pode ser realizado através da pesquisa do parasita em órgãos, tecidos e fluidos biológicos (sangue e líquido cefalorraquidiano). Em laboratórios de análises clínicas os testes serológicos são os mais utilizados. A detecção quantitativa de anticorpos IgG e IgM para a pesquisa de *Toxoplasma gondii* pode ser realizada em soro e plasma através de várias técnicas sendo a quimioluminescência a técnica utilizada no laboratório Avelab (Tabela VI).

É essencial no período pré-natal a pesquisa destes anticorpos para que em caso de suspeita clínica sejam tomadas medidas preventivas e terapêuticas de forma a reduzir a taxa de transmissão vertical e subsequentemente de danos fetais. [76]

No Laboratório Médico Avelab quando um resultado é reativo para a pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma (IgG e IgM), o ensaio é repetido. Caso se confirme o resultado reativo, a amostra é enviada para um laboratório no exterior para a realização de um teste confirmatório por outro método.

**Tabela V-**: Interpretação dos resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma

<b>Resultados</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Medidas recomendadas</b>
<b>IgM - IgG -</b>	Ausência de infecção e consequentemente de imunidade.	Vigilância Serológica Mensal.
<b>IgM + IgG -</b>	Presença de IgM não específica ou início de uma infecção.  O ensaio deve ser repetido.	Após a repetição do ensaio:  -Se o valor dos títulos permanecer constante estamos perante uma IgM não específica.  -O aumento da IgM e/ou aparecimento do título IgG é indicativo de uma primo-infecção.  Deve ser realizado uma consulta de alto risco para a realização do diagnóstico pré-natal,
<b>IgM - IgG +</b>	Infeção relativamente antiga (imunidade) ou uma primo-infecção sem IgM.  O ensaio deve ser repetido.	Após a repetição do ensaio:  -IgM negativo e IgG estável é indicativo de imunidade estabelecida  -IgM negativo e IgG aumentada é indicativo de uma primo – infecção sem IgM. O teste da Avidéz deve ser realizado.
<b>IgM + IgG +</b>	Infeção recente. Realização do teste da avidéz (IgG).	-A presença de uma Avidéz forte indica que a infecção ocorreu há mais de 4 meses.  -Na presença de uma Avidéz fraca/intermédia deve ser realizado uma consulta de alto risco para a realização do diagnóstico pré-natal.

## 8.8 Citomegalovirus

Os citomegalovírus são vírus ubíquos com elevada especificidade de espécie e o Homem é o seu único reservatório. A infecção por CMV encontra-se disseminada por todo o mundo, mas a sua prevalência depende da idade, fatores geográficos e das condições socioeconómicas da população. As infeções por CMV são geralmente assintomáticas e



autolimitadas, contudo em determinados casos, podem causar graves patologias em fetos, crianças e adultos. [77,78,79]

É um vírus pertencente ao género *Cytomegalovirus* e à sub-família *Betaherpesvirinae*. Possui um genoma de DNA de cadeia dupla com capacidade de se replicar em vários tipos de células *in vivo* como monócitos, linfócitos T, linfócitos B e leucócitos polimorfonucleares. *In vitro* crescem em fibroblastos humanos. [80,81] A transmissão pode ocorrer por contacto sexual, transplante de órgãos, fluídos corporais infetados, transfusões sanguíneas, por exposição direta ou por via congénita (intrauterina, perinatal e pós-natal). Por este motivo pode ser detetado no leite materno, saliva, fezes, urina, sangue, secreções cervicovaginais e sémen. [77]

Possui um período de incubação de 3 a 12 semanas na qual ocorre um aumento da replicação viral e consequente disseminação pelo organismo. [82] O CMV pode estabelecer infeções latentes em leucócitos, tecido linfoide, rins e glândulas secretoras. A reativação da infeção pode ocorrer em casos de imunossupressão do sistema imunitário e é controlada pela imunidade mediada por células T citotóxicas e células NK. [78]

Em indivíduos saudáveis a infeção por CMV é normalmente assintomática, contudo em indivíduos imunocomprometidos pode causar doenças severas como insuficiência hepática fulminante, retinite, esofagite, colite e em casos mais severos pode levar à morte. [82]

Nas grávidas é essencial a pesquisa do CMV uma vez que este vírus é responsável pela ocorrência de infeções virais nos fetos e recém-nascidos por via intrauterina e perinatal. A transmissão intrauterina pode ocorrer em mulheres que desenvolvem uma infeção primária durante a gravidez, em mulheres com anticorpos pré-existentes devido a uma reativação ou em mulheres que adquiram uma nova estirpe viral (não primária). A primo-infeção esta associada a um maior risco de infeção do feto, estimando-se que 30-35% serão afetados. Por outro lado, nas infeções não-primárias 1,1-1,7 % dos fetos serão afetados. [79]

Uma infeção congénita afeta 0,2-2,2% de todos os nascimentos. Aproximadamente 10-15% dos recém-nascidos desenvolvem a doença das Inclusões Citomegálicas, cujas manifestações clínicas incluem anomalias neurológicas, microcefalia, icterícia, hépato-esplenomegalia, petéquias, surdez neuro-sensorial, entre outros. Cerca de 85-90% dos recém-nascidos não apresentam sintomatologia, contudo 10 a 15% apresentam manifestações tardias como atraso psicomotor, surdez e alterações oculares.

O diagnóstico laboratorial do citomegalovirus é realizado através da pesquisa quantitativa de anticorpos IgG e IgM, que avaliam o estado imunológico do utente (Tabela VII). O estudo dos anticorpos deve ser realizado previamente à conceção, para evitar a infeção

fetal em casos de suspeita clínica e para que possam ser tomadas medidas profiláticas, uma vez que não existe nenhuma vacina licenciada para CMV.

No Laboratório Médico Avelab quando um resultado é reativo para a pesquisa de anticorpos anti-CMV (IgG e IgM), o ensaio é repetido. Caso se confirme o resultado reativo, a amostra é enviada para o laboratório de Ambar para a realização de um teste confirmatório por imunoblot.

**Tabela VI:** Interpretação dos resultados serológicos para a pesquisa de anticorpos anti-CMV [5]

<b>Resultados</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Medidas recomendadas</b>
<b>IgM - IgG -</b>	Ausência de imunidade contra o CMV	Devem ser tomadas medidas profiláticas
<b>IgM + IgG -</b>	Presença de IgM não específica ou início de uma infecção Após 4 semanas o ensaio deve ser repetido	Após a repetição do ensaio: -Se o valor do título permanecer constante estamos perante uma IgM não específica -O aumento da IgM e/ou aparecimento do título IgG é indicativo de uma primo-infecção.
<b>IgM - IgG +</b>	Valores elevados de IgG indicam a presença de anticorpos contra o CMV (imunidade) Valores baixos de IgG indicam que o ensaio deve ser repetido ao fim de 3 semanas	Após a repetição do ensaio: -IgG e IgM constantes são indicativo de uma infecção antiga -Um aumento de quatro vezes ou mais do título IgG indica uma infecção ativa sem IgM -O aumento de anticorpos IgG ou o aparecimento de anticorpos IgM é indicativo de uma reinfeção
<b>IgM + IgG +</b>	Infeção recente ou pode tratar-se de um resultado falso positivo devido a IgM residuais	O ensaio deve ser repetido em soro e plasma para confirmação do resultado

## 8.9 Validação de resultados no setor da Imunologia

No setor da Imunologia do laboratório Avelab, os resultados obtidos são transmitidos automaticamente para o sistema Apollo. Contudo, não existe validação automática. Os técnicos responsáveis pelo setor devem ter espírito crítico durante a validação e intercalar os parâmetros imunológicos das diferentes amostras com os seus conhecimentos teóricos e com a informação clínica fornecida. Com base na informação obtida num laboratório de análises, o clínico pode direcionar o diagnóstico e a monitorização da terapêutica de diversas patologias. Durante o estágio tive a oportunidade de observar e processo de validação de resultados, bem como interligar conhecimentos adquiridos durante o mestrado.

## **Conclusão**

Ao longo dos 6 meses de estágio no laboratório Avelab pude tirar muitas lições tanto para a minha vida pessoal como profissional.

Durante o estágio coloquei em prática todos os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do mestrado. Aprendi a ser autónoma e a ter espírito crítico na tomada de decisões face a problemas que possam ocorrer no laboratório, e a trabalhar em equipa tendo sempre em vista a prestação do melhor serviço possível.

O laboratório Avelab rege-se por um elevado rigor científico tanto na execução dos diferentes procedimentos laboratoriais como dos técnicos que os executam. O trabalho de equipa é outra das premissas do laboratório porque só desta forma é que podemos garantir a qualidade dos resultados para todos os utentes.

Para além disso, tive ainda a oportunidade de manusear amostras biológicas e participar no controlo e calibrações dos equipamentos. Para diminuir a ocorrência de erros, é fundamental a interligação de conhecimentos de todas as áreas clínicas de modo a que a validação dos resultados não apresente nenhuma desconformidade.

Para concluir, este mestrado preparou-me de forma exímia para o mercado de trabalho e tudo graças aos excelentes professores que sempre estiveram disponíveis para nos ajudar e ao estágio curricular que nos foi proporcionado.

Após a conclusão do estágio, foi-me oferecido uma oportunidade de trabalho no Laboratório Avelab, onde me encontro a trabalhar neste momento e onde diariamente coloco em prática tudo o que me foi ensinado.



## 9 Referências Bibliográficas

1. NJOROGE, S. W.; NICHOLS, J. H. –**Risk Management in the Clinical Laboratory**. *Annals of Laboratory Medicine*. 34:4 [2014], 274-278
2. LENICEK Krleza, J *et al.*- **Post-analytical laboratory work: national recommendations from the Working Group for Post-analytics on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine**. *Biochemia Medica*. 29:2 (2019), 228–261.
3. HAMMERLING, J. A.- **A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today**. *Laboratory Medicine*. 43:2 (2012), 41–44.
4. FONSECA, Ana *et al.* - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004.
5. M. L. Bayot and P. Tadi, **Laboratory Tube Collection**. 2022.
6. RHOADS, D. D. *et al.* -**Clinical Microbiology Informatics**. *Clinical Microbiology Reviews*. 27:4 (2014), 1025–1047.
7. MOYES, Rita B.; REYNOLDS, Jackie; BREAKWELL, Donald P. - **Differential Staining of Bacteria: Gram Stain**. *Current Protocols in Microbiology*. Vol. 15, nº1 (2009), A.3C.1-A.3C.8.
8. CHAPIN, Kimberle C. – **Principles of Stains and Media**. In: Murray, Patrick R.; Baron, Ellen Jo; Jorgensen, James H.; Landry, Marie Louise; Pfaller, Michael A. – *Manual of Clinical Microbiology Volume I*. 9ª Ed. Washington DC: ASM Press (2007) pp 181-191
9. ZAMAN, Z. *et al.* -**Urine sediment analysis: Analytical and diagnostic performance of sediMAX® -A new automated microscopy image-based urine sediment analyser**. *Clinica Chimica Acta*, 411(3-4) (2010), 147–154.
10. CARROLL, K. C. *et al.* -**Evaluation of the BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterobacteriaceae**. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:10 (2006), 3506–3509.
11. MERLINO, J. *et al.* -**Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and Enterococcus species**. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:7 (1996), 1788–1793.

12. DARKOH, C. *et al.* -**A rapid and specific method for the detection of indole in complex biological samples.** *Applied and Environmental Microbiology.* 81:23 (2015), 8093–8097.
13. STELL, K. J. -**The oxidase reaction as a taxonomic tool.** *Microbiology.* 25:2 (1961), 297-306.
14. FIORES-MIRELES, A. L. *et al.* -**Urinary Tract infections: epidemiology, Mechanisms of Infection and Treatment Options.** *Nature Reviews Microbiology.* 13:5 (2015), 269–284.
15. M. J. Bono, S. W. Leslie, and W. C. Reygaert, **Urinary Tract Infection.** 2022.
16. CHAVES, COSTA, L. *et al.* -**Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos.** *Rbac.* 42:3 (2010), 175-180.
17. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN Jr, W. C. **Diagnóstico microbiológico.** 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2008.
18. UNGUREANU, A. *et al.* -**Staphylococcus aureus colonisation in patients from a primary regional hospital.** *Molecular Medicine Reports,* 16:6 (2017), 8771–8780.
19. KONG, C.; NEOH, H.; NATHAN, S. -**Targeting Staphylococcus aureus Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy.** *Toxins,* 8:3 (2016), 72.
20. GORDON, Rachel J.; LOWY, Franklin D. -**Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection.** *Clinical Infectious Diseases.* 46:S5 (2008), S350–S359.
21. MOSTOFSKY, E.; LIPSITCH, M.; REGEV-YOCHAY, G. -**Is methicillin-resistant Staphylococcus aureus replacing methicillin-susceptible S. aureus?.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 66:10 (2011), 2199–2214.
22. CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. -**Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus.** *Virulence.* 12:1 (2021), 547–569.
23. MAN, W. H. *et al.* -**Bacterial and viral respiratory tract microbiota and host characteristics in children with lower respiratory tract infections: a matched case-control study.** *The Lancet Respiratory Medicine.* 7:5 (2019), 417–426.

24. DORCA, J.; TORRES, A. -**Lower respiratory tract infections in the community: towards a more rational approach.** *European Respiratory Journal.* 9:8 (1996), 1588–1589.
25. EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D.; RHEE, K. Y. -**Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Nature Reviews Microbiology.* 16:8 (2018), 496–507.
26. SATYAPUTRA, F. *et al.* -**The Laboratory Diagnosis of Syphilis.** *Journal of Clinical Microbiology.* 59:10 (2021), e00100-21.
27. NAYAK, S.; ACHARJYA, B. -**VDRL test and its interpretation.** *Indian Journal of Dermatology.* 57:1 (2012), 3-8.
28. KASHYAP, B. *et al.* -**Evaluation of *Treponema pallidum* Hemagglutination Assay among Varying Titers of the Venereal Disease Research Laboratory Test.** *Indian Journal of Dermatology.* 63:6 (2018), 479–483.
29. HU, B.; GUP, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.-L. - **Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19.** *Nature Reviews Microbiology.* 19:3 (2021), 141–154.
30. HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG P.- **Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis.** *Trends in Immunology.* 41:12 (2020), 1100-1115.
31. JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H.- **Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 23:1 (2022), 3–20.
32. CAO, Y. *et al.*- **Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin and Inhibitors.** *Protein Science.* 30:6 (2021), 1114-1130.
33. SINGH, J. *et al.* - **Evolutionary trajectory of SARS-CoV-2 and emerging variants.** *Virology Journal.* 18:1 (2021), 166.
34. Chaplin, D. D. **Overview of the immune response.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125:2 (2010), S3–S23.
35. ZABRISKIE, J. B. – **Essential Clinical Immunology.** Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-51681-5.
36. KAREN, L. Cox. *et al.*- **Immunoassay Methods.** In: *Assay Guidance Manual.* Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 2019. PMID: 22553884.

37. A.M. García- Campaña, W.R.G. Baeyens- **Principles and recent analytical applications of chemiluminescence**. ANALUSIS. Vol. 28, n°8 (2000), 686-698.
38. LINDA, M. McManus and Richard Mitchell, Eds., **Pathobiology of Human Disease**, First Edition. 2014.
39. PARR, A. C. -**The candela and photometric and radiometric measurements**. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology. 106:1 (2001), 151.
40. SARKAR, S. -**Redox Cycling Without Reference Electrode**. The Analyst, 139:22 (2014), 6052–6057.
41. KOTZEV, A.; DRAGANOV, P. -**Carbohydrate Antigen I9-9, Carcinoembryonic Antigen, and Carbohydrate Antigen 72-4 in Gastric Cancer: Is the Old Band Still Playing?** Gastrointestinal Tumors. 5:1-2 (2018), 1–13.
42. SCHIFFMAN, J. D.; FISHER, P. G.; GIBBS, P. -**Early Detection of Cancer: Past, Present, and Future**. American Society of Clinical Oncology Educational Book. 35:35 (2015), 57–65.
43. SHARMA, S. -**Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines**. Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology. 30:1 (2009), 1-8.
44. LEE, T.; TENG, T. Z. J.; SHELAT, V. G.- **Carbohydrate antigen I9-9 — tumor marker: Past, present, and future**. World Journal of Gastrointestinal Surgery. 12:12 (2020), 468–490.
45. MOLINA, V. *et al.*- **CA I9–9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer**. Tumor Biology. 33:3 (2012), 799–807.
46. HE, Y.; LU, H.; ZHANG, L. **Serum AFP levels in patients suffering from 47 different types of cancers and noncancer diseases**. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 162 (2019). 199–212.
47. WANG, X.; WANG, Q.- **Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity**. Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2018 (2018), 1–8.
48. FEJZIĆ, H.; MUJAGIC, S.; AZABAGICA, S.; BURINA, M.-**Tumor marker CA 15-3 in breast cancer patients**. Acta Medica Academica. 44:1 (2015), 39–46.



49. DOCHEZ, V. *et al.*- **Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA a review.** *Journal of Ovarian Research.* 12:28 (2019).
50. WANG, Y. *et al.* - **MUC16 expression during embryogenesis, in adult tissues, and ovarian cancer in the mouse.** *Differentiation; Research in Biological Diversity.* 76:10 (2008), 1081-1092.
51. LALOGLU, E *et al.* **Serum endocan levels in endometrial and ovarian cancers.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 31:5 (2016), e22079.
52. PERKINS, G. L. *et al.* -**Serum tumor markers.** *American Family Physician.* 68:6, (2003), 1075–1082
53. MENG, Q. *et al.*- **Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis.** *OncoTargets and Therapy.* 10 (2017), 4591–4598.
54. HALL, C. *et al.*-**A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice.** *Annals of Coloproctology.* 35:6 (2019), 294-305.
55. PRPIĆ, M. *et al.*- **Thyroglobulin as a Tumor Marker in Differentiated Thyroid Cancer – Clinical Considerations.** *Acta Clinica Croatica.* 57:3 (2018), 518-527.
56. BÍLEK, R.; DVORAKOVÁ, M.; GRIMMICHOVÁ, T.; JISKRA, J. -**Iodine, thyroglobulin and thyroid gland.** *Physiological Research.* 69: Suppl 2 (2020), S225–S236
57. CHOUDHURY, P. S.; GUPTA, M. -**Differentiated thyroid cancer theranostics: radioiodine and beyond.** *The British Journal of Radiology.* 91:1091: (2018), 20180136.
58. SONG, J. M.; KIM, C.-B.; CHUNG, H. C.; KANE, R. L. -**Prostate-Specific Antigen, Digital Rectal Examination and Transrectal Ultrasonography: A Meta-Analysis for This Diagnostic Triad of Prostate Cancer in Symptomatic Korean Men.** *Yonsei Medical Journal.* 46:3 (2005), 414.
59. NWABUOBI, C. *et al.* -**hCG: Biological Functions and Clinical Applications.** *International Journal of Molecular Sciences.* 18:10 (2017), 2037.
60. HEIDEGGER, H.; JESCHKE, U.- **Human Chorionic Gonadotropin (hCG)—An Endocrine, Regulator of Gestation and Cancer.** *International Journal of Molecular Sciences.* 19:5 (2018), 1502.

61. DIECKMANN, K.-P. *et al.* -**Serum Tumour Markers in Testicular Germ Cell Tumours: Frequencies of Elevated Levels and Extents of Marker Elevation Are Significantly Associated with Clinical Parameters and with Response to Treatment.** *BioMed Research International.* 2019 (2019), 1-22.
62. GRENACHE, D. G. -**Progress in understanding the use of human chorionic gonadotropin as a tumor marker.** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 58:3 (2020), 323–325.
63. FANALES-BELASIO, E. *et al.* - **HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview.** *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanità.* 46:1 (2010), 5–14.
64. VAIJPAYEE, M.; NEGI, N.; KURAPATI, S. -**The enduring tale of T cells in HIV immunopathogenesis.** *The Indian Journal of Medical Research.* 138:5 (2013), 682–699.
65. DUBROW, R. -**HIV infection, aging, and immune function: implications for cancer risk and prevention.** *Current Opinion in Oncology.* 24:5 (2012), 506–516.
66. BAZIN, G. R. *et al.*- **Terapia antirretroviral em crianças e adolescentes infectados pelo HIV: o que sabemos após 30 anos de epidemia.** *Cadernos de Saúde Pública.* 30:4 (2014), 687–702.
67. SAKATA, M.; MORI, Y.-**The life cycle of Rubella Virus.** *Uirusu.* 64:2 (2014), 137–146.
68. LEE, J.-Y.; BOWDEN, D. S. -**Rubella Virus Replication and Links to Teratogenicity.** *Clinical Microbiology Reviews.* 13:4 (2000), 571–587.
69. CAMEJO LEONOR, M.; MENDEZ, M. D. (2020). **Rubella.**
70. SHUKLA, S.; MARAQ, N. F. (2020). **Congenital Rubella.**
71. LIMA, T. S.; LODEN, M. B. -**Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by Toxoplasma gondii.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 9 (2019).
72. ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M.-L. -**Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis.** *Clinical Microbiology Reviews.* 25:2 (2012), 264–296.
73. TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. -**Toxoplasma gondii: from animals to humans.** *International Journal for Parasitology.* 30(12-13) (2000), 1217–1258.

74. ATTIAS, M. *et al.* -**The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations.** *Parasites & Vectors.* 13:1 (2020).
75. WEISS, L. M.; KIM, K. -**THE DEVELOPMENT AND BIOLOGY OF BRADYZOITES OF TOXOPLASMA GONDII.** *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library.* 5 (2000), D391–D405.
76. GOMES, G. B.; Barros, RODRIGUES, A.B-C; CÂNDIDO, W. P. -**Importância do diagnóstico da toxoplasmose nno pré-natal: Uma análise sobre a incidência em rondônia.** *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research -BJSCR BJSCR.* 30:3 (2020), 2317–4404.
77. VIDE TAVARES, M. -**Cytomegalovirus: is there a place for screening during pregnancy?.** *Acta Medica Portuguesa,* 24 Suppl 4, (2011), 1003–1108.
78. LAUTENSCHLAGER, I. -**CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation.** *Transplant International.* 22:11 (2009), 1031–1040.
79. MARSICO, C.; KIMBERLIN, D. W. -**Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment.** *Italian Journal of Pediatrics,* 43:1 (2017).
80. KENNESON, A.; CANNON, M. J. – **Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection.** *Reviews in medical virology.* 17:4 (2007), 253-276.
81. **Divisão de Saúde Materna, Infantil e dos Adolescentes – Saúde Reprodutiva: Doenças Infecciosas e Gravidez: Orientações Técnicas II.** Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2000.
82. GUPTA, M.; SHORMAN, M. (2020). **Cytomegalovirus.**