



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniel Borely Ferreira Torres

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos e pela Dra. Luísa Maria Frazão Rodrigues, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2023

Daniel Borely Ferreira Torres

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos e pela Dra. Luísa Maria Frazão Rodrigues, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2023

"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade."

Dra. Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Marie Curie, a Rosalind Franklin, a Albert Einstein, a Darwin, a Galileu Galilei, a Gregor Mendel, a Platão e diversas outras personalidades extremamente importantes para a educação e a ciência, tornando o mundo menos obscuro e livre de medos, de seres místicos e mitológicos, através do pensamento crítico e da pesquisa científica.

À minha bisavó, Guanayra (*in memoriam*), aos meus avós, José (*in memoriam*) e Lúcia, e à minha mãe, Karla, por terem dedicado, desde o meu nascimento, toda a atenção possível para a minha formação como pessoa e como profissional.

À minha irmã Beatriz, por todo carinho, apoio e amor incondicional.

Ao meu marido Luiz, que esteve comigo desde antes do início da minha licenciatura.

À colega do mestrado, Francisca, pela amizade e pelas ajudas indispensáveis para o meu processo académico, partilhando resumos e apontamentos.

Aos professores do mestrado, especialmente à minha orientadora Doutora Armanda Santos.

À minha chefe, Dra. Luísa, e aos meus colegas de trabalho, Nuno, Sofia, Carlos, Filipe, Alberto, Hugo, Patrícia e Luís, pelos sábios e valiosos conselhos, e pelas trocas no horário de trabalho.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	13
Resumo	17
Abstract	18
Introdução.....	19
Fase pré-analítica.....	20
Fase analítica	22
Fase pós analítica.....	22
1) Imunologia.....	23
1.1) Testes de aglutinação	23
1.1.1) Título Antiestreptolisina O (tASO).....	23
1.1.2) Fator Reumatoide	23
1.1.3) RPR - <i>Rapid Plasm Reagin</i>	24
Caso Clínico 1	24
1.1.4) Determinação do Grupo Sanguíneo e do Fator Rh	25
1.1.5) Teste de <i>Coombs</i> direto e indireto	26
1.2) Imunocromatografia.....	27
1.2.1) Teste Imunológico de Gravidez (TIG).....	27
1.2.2) Toxicologia	28
1.2.3) SARS-CoV-2 Ag (Teste rápido).....	28
Caso Clínico 2	28
Caso Clínico 3	28
1.3) Reações automatizadas	29
1.3.1) Toxoplasmose.....	31
Caso Clínico 4	33
Caso Clínico 5	33
1.3.2) Imunoglobulina E (IgE) total.....	34
2) Técnicas Manuais.....	34
2.1) Espermograma	34
3) Hemostase	35
3.1) Tempo de Protrombina (TP).....	35
3.2) Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa).....	36
3.3) Fibrinogénio.....	36
4) Microbiologia.....	36
4.1) Bacteriologia	36
4.1.1) Coloração de Gram.....	36
4.1.2) Cultura de produtos em meios cromogénicos e antibiograma.....	38

4.2) Urina	39
4.2.1) Análise Sumária da Urina (Urina II).....	39
4.3) Micologia	41
4.4) Fezes	41
4.4.1) Parasitologia	41
4.4.2) Coprocultura.....	41
5) Setor de Biologia Molecular.....	43
Caso clínico 6.....	45
Caso clínico 7	46
6) Hematologia.....	47
6.1) Hemograma.....	47
6.2) Esfregaço de sangue periférico	48
6.3) Contagem de reticulócitos	49
6.4) Velocidade de Sedimentação (Automatizado)	50
6.4.1) Velocidade de sedimentação (Manual)	51
7) Bioquímica Clínica	51
7.1) Hemoglobina Glicada - HbA1C	52
Conclusão	55
Bibliografia.....	57

Índice de Figuras

- Figura 1.** 1 - Suporte de utilização única (Holder); 2 - Agulha para sistema a vácuo; 3 - Tubo com citrato de sódio a 3,8%; 4 e 5 - Tubos com ativador de coágulo e gel separador; 6 - Tubo com EDTA K3; 7 - Tubo com 0,03mL de citrato de sódio..... 21
- Figura 2.** Diluição seriada do soro do utente, para realização da titulação do teste não treponémico. 24
- Figura 3.** Círculo 1 - 50 uL de soro do utente + 20 uL de reagente RPR, revelando resultado qualitativo positivo; Círculos 2 a 6, contém diluição seriada + reagente RPR, revelando resultado semi-quantitativo positivo até a diluição 1/16, no círculo 5; Círculo 7 - Controlo Positivo; e Círculo 8 - Controlo Negativo..... 25
- Figura 4.** A prova globular é feita no ID-Card da DiaClon, onde A contém anticorpos anti-A, B contém anticorpos anti-B, AB contém anticorpos anti-A e anti-B, DVI+ e DVI- contém anticorpos para as variantes D, ctl é o controlo da reação e deve sempre ser negativo. Primeiro é feita a diluição de 50µL de sangue total em 500µL de diluente. Em seguida, é adicionado 10µL dessa suspensão, em cada poço, 10µL. Quando ocorre reação antigénio-anticorpo, forma-se um coágulo que fica retido na parte superior do gel, significando um resultado positivo. Quando essa reação não ocorre, os componentes sanguíneos atravessam o gel livremente e depositam-se na parte inferior do gel, significando um resultado negativo. 1 - Tipo sanguíneo A, fator Rh Positivo (A+); 2 - Tipo sanguíneo A, fator Rh negativo (A-); 3 - Tipo sanguíneo zero, fator Rh Positivo (0+)..... 26
- Figura 5.** A - Reagentes para reação de *Coombs* indireto, fornecido pela Bio-Rad Portugal; B - card do teste de *Coombs* indireto, com resultado negativo. 27
- Figura 6.** Representação da Imunocromatografia de fluxo lateral, expondo a membrana, a amostra com antígenos e os anticorpos necessários para realizar o procedimento (16)..... 28
- Figura 7.** Cassete de teste rápido para SARS-CoV-2, onde C significa controlo e deve sempre surgir a linha vermelha, indicando a boa qualidade do teste. A região T quando o teste é negativo não apresenta linha vermelha, e quando o teste é positivo, apresenta a linha vermelha. A - Resultado negativo; B - Resultado positivo. 29
- Figura 8.** Aparelho Beckman-Coulter Unicel Dxl 600, utilizado na determinação de TSH, PSA total e livre, T4 livre, T3 total e livre, LH, FSH, Estradiol, Prolactina, Vitamina D, Vitamina B12 e Ácido Fólico. 30
- Figura 9.** Aparelho Biomérieux Vidas, onde realiza-se a determinação de Testosterona total, CEA, Ca 19-9, Ca 125, AFP, HCG, Cortisol, dentre outras determinações, com base nos princípios ELFA - *Enzyme Linked Fluorescence Immunoassay*. A - Embalagem do fornecedor; B - Cone ou Recetáculo; C - Barrete ou Fita com os reagents necessários..... 31
- Figura 10.** Imagem produzida em formato de tabela, com base nos dados lecionados na cadeira de parasitologia, acerca do diagnóstico da toxoplasmose em gestantes, e com base na literatura (23). 32
- Figura 11.** Aparelho ACL9000, utilizado para realizar os ensaios de Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa) e Fibrinogénio..... 35
- Figura 12.** Representação do procedimento de coloração de Gram (31). 37

Figura 13. A - Reagentes para coloração de Gram; B - Visualização por microscópio óptico, ampliação de 1000x, com óleo de imersão, de bacilos Gram negativos e de cocos Gram positivos.....	37
Figura 14. Ilustração das paredes bacterianas Gram positiva e Gram negativa (32).	38
Figura 15. A - Observação de colónias de <i>Escherichia coli</i> , em meio chromID® CPS® Elite (CPSE), identificadas pelo tom castanho arroxeadado; B - Galeria de antibiograma, fornecida pela Biomérieux, para teste de suscetibilidade aos antibióticos.	38
Figura 16. Aparelho Aution Max AX-4280, onde realiza-se a análise físico-química da urina.	39
Figura 17. Lâmina de sedimento urinário, observadas ao microscópio ótico, aumento 400x. É possível observar bacteriúria (seta amarela), leucócitos (seta vermelha) e células epiteliais (seta azul).	40
Figura 18. Lâmina de sedimento urinário, observadas ao microscópio ótico, ampliação de 400x. É possível observar bacteriúria (círculo amarelo), e cristais trifosfato (seta azul).	40
Figura 19. Microscópio da marca LEICA, Modelo I34952IX, utilizado para diversas técnicas.	41
Figura 20. Caldo selenito, um meio de enriquecimento, pois possui citrato e desoxicolato de sódio, que impedem o crescimento da microbiota intestinal normal e possibilita a multiplicação dos reais enteropatógenos (<i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>).	42
Figura 21. Classificação de Baltimore, dos vírus, de acordo com seu material genómico...43	
Figura 22. Representação esquemática da partícula viral e do genoma do b-Coronavírus. A: partícula viral; B: genoma viral.....	44
Figura 23. Termociclador, comprado à BIO-RAD Portugal.....	45
Figura 24. Gráfico gerado pelo software Bio-Rad CFX Maestro. A - Gene N; B - Gene ORF; C - Controlo interno; D - Cut-off Gene N; E - Cut-off Gene ORF; F - Cut-off Controlo interno.	46
Figura 25. Gráfico gerado pelo software Bio-Rad CFX Maestro. A - Amplificação tardia do Gene N; B - Amplificação esperada do Controlo interno; C - Ligeira amplificação tardia do Gene ORF; D - Cut-off Gene N; E - Cut-off Gene ORF; F - Cut-off Controlo interno.	47
Figura 26. Horiba Pentra XL80, aparelho utilizado para realizar os hemogramas (série vermelha, série branca e plaquetas). Imagem ilustrativa da técnica, extraída do manual do equipamento (39).	48
Figura 27. Realização de um esfregaço sanguíneo.	48
Figura 28. Erros mais comuns na confeção do esfregaço sanguíneo.....	49
Figura 29. A - Corantes May-Grünwald Giemsa; B - Lâmina sangue produzida por mim; C - Visualização ao microscópio ótico, ampliação de 400x, onde é possível observar numerosos eritrócitos (seta verde) e um neutrófilo hipersegmentado (seta vermelha).	49

Figura 30. A - Corante Azul Brillhante de Cresil; B - Lâmina de sangue total (EDTA) corada com azul brilhante de cresil; C - Visualização ao microscópio ótico, ampliação de 1000x, com óleo de imersão, eritrócitos (seta azul) e reticulócitos (seta verde).	50
Figura 31. Ves-Matic 30, aparelho utilizado para velocidade de sedimentação.....	50
Figura 32. 1 - Tubo de Westergren; 2 - Tubo de Westergren recém preenchido com sangue total com EDTA; 3 - Tubo de Westergren ao fim de 1 hora, revelando como resultado 15mm/hora.....	51
Figura 33. Aparelho Beckman-Coulter AU480, onde realiza-se a determinação diversos analitos como a Glicose, Ureia, Creatinina, Bilirrubinas, Ácido Úrico, Colesterol Total, HDL e LDL, Triglicéridos, Fosfatase alcalina, AST/TGO, ALT/TGP, GGT, Amilase, Lipase, LDH, CK, Proteínas totais e Albumina, entre outros.	52
Figura 34. Aparelho Adams HA-8160.....	53

Índice de Tabelas

Tabela I. Apresentação da ordem da colheita, cores das tampas dos tubos, respectivos aditivos e sua aplicação	21
--	----

Abreviaturas

-ssRNA - RNA Cadeia Simples Negativa

+ssRNA - RNA Cadeia Simples Positiva

Ac - Anticorpo

AcHBc - Anticorpo contra o Core Viral do Vírus da Hepatite B

AcHBe - Anticorpo contra o Antígeno “e” do Vírus da Hepatite B

AcHBs - anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

AcHCV - Anticorpo contra o Vírus da Hepatite C

AcHIV - Anticorpo contra o Vírus da Imunodeficiência Humana

ADP - Adenosina Difosfato

AFP - Alfafetoproteína

Ag - Antígeno

AgHBe - Antígeno “e” do Vírus da Hepatite B

AgHBs - antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

ALT/TGP - Alanina Aminotransferase

API - Índice de Perfil Analítico

AST/TGO - Aspartato Aminotransferase

ATP - Adenosina Trifosfato

Ca 125 - Antígeno Cancerígeno 125

Ca 19-9 - Antígeno de hidrato de carbono 19-9

CAN - Meio cromogénico Cândida

cDNA - DNA complementar

CEA - Antígeno carcinoembrionário

CHE - Colesterol Esterase

CHO - Colesterol Oxidase

CK - creatinoquinase

CLIA - Chemiluminescent Imunoassay

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

COVID-19 - Doença por Coronavírus 2019

CPSE - chromID® CPS® Elite

Ctl - Controlo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Dr. - Doutor

Dra. - Doutora

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELFA - *Enzyme Linked Fluorescence Immunoassay*
FSH - Hormona Folículo-estimulante
G6P-DH - Glucose-6-fosfato Desidrogenase
GGT - Gamaglutamiltranspeptidase
GLDH - Glutamato-desidrogenase
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogénio
HAV - Vírus da Hepatite A
HbA1c - Hemoglobina Glicada
hCG - gonadotrofina coriônica humana
HDL - Lipoproteína de Alta Densidade
HE - Hemaglutinina-esterase
HK - Hexoquinase
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance
IgE - Imunoglobulina E
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
K3EDTA - Sal de potássio do ácido etilenodiaminotetracético
Lda. - Limitada
LDH - Lactato Desidrogenase
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade
LES - Lúpus Eritematoso Sistémico
LH - Hormona Luteinizante
mRNA - RNA mensageiro
NAD⁺ - Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
ORF - *Open Reading Frames*
PCR - Proteína C Reativa
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
pH - Potencial de Hidrogênio
POD - peroxidase
PSA - Antígeno Específico da Próstata
RFU - Unidade de Fluorescência Relativa
RJ - Rio de Janeiro
RNA - Ácido Ribonucleico

RPM - Rotações Por Minuto

RPR - *Rapid Plasm Reagin*

rtPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

SARS-Cov-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SGC2 - Meio cromogénico Sabouraud

SINAVE - Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

T3 - Tri-iodotironina

T4 - Tetraiodotironina

tASO - Título Antiestreptolisina O

THC - Tetrahydrocannabinol

TIG - Teste Imunológico de Gravidez

TP - Tempo de Protrombina

TRH - Hormona Libertadora de Tireotrofina

TSH - Hormona Estimulante da Tireoide ou Tirotropina

TTPa - Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

VLDL - Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

VS - Velocidade de Sedimentação

Resumo

Foi no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Rodrigues, onde exerço funções profissionais, enquanto membro efetivo, como Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica, ramo de Análises Clínicas, que realizei o estágio curricular do Mestrado. É nesse laboratório onde tenho a oportunidade de aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do percurso acadêmico, além claro de adquirir novos, e me aperfeiçoar enquanto profissional e ser humano, através das práticas e do contato com o público.

Foi pelos setores de Biologia Molecular, onde já exerci durante 3 anos, de 2014 a 2017, na Instituição Oswaldo Cruz / FIOCRUZ - RJ, com pesquisa científica sobre a interação entre Flebotomíneos e Rhabdovírus, e Imunologia/Virologia que desenvolvi maior interesse, e por esse motivo decidi selecioná-las para descrever as metodologias usadas, os critérios de avaliação e a interpretação dos resultados obtidos, através da descrição e da exposição de casos clínicos.

No decorrer deste Mestrado pude comprovar a relevância que as análises clínicas têm no diagnóstico, no prognóstico, na prevenção de patologias, e também na monitorização das terapêuticas.

Com o avanço da tecnologia, cada vez mais é possível executar técnicas e gerar resultados com maior rapidez e segurança, aliado com todo rigor que mantém a qualidade e a fiabilidade.

Palavras-chave: Análises clínicas; Virologia; Imunologia; Biologia Molecular; Casos Clínicos.

Abstract

It is at the Laboratory of Clinical Analysis Dr. Joaquim Rodrigues, where I exercise professional functions, as an effective member, as a Superior Technician of Diagnosis and Therapeutics, Clinical Analysis branch, that I carried out the master's internship. It is in this laboratory that I have the opportunity to apply the knowledge acquired throughout my academic career, in addition to acquiring new ones, and improving myself as a professional and a human being, through practices and the contact with the public.

Was through the Immunology/Virology and Molecular Biology sectors, where I have worked for 3 years, from 2014 to 2017, at the Oswaldo Cruz Institution / FIOCRUZ - RJ, with scientific research on the interaction between Phlebotomines and Rhabdoviruses, that I developed a greater interest, and for this reason I decided to select them to describe the methodologies used, the evaluation criteria and the interpretation of the results obtained, through the description and presentation of clinical cases.

During this Master's Degree, I was able to prove the relevance that clinical analyzes have in the diagnosis, prognosis, prevention of pathologies and also in the therapies' monitorization.

With the advancement of technology, it is increasingly possible to perform techniques and generate results quickly and safely, combined with all the rigor that maintains quality and reliability.

Keywords: Clinical analysis; Virology; Immunology; Molecular biology; Clinical Cases.

Introdução

As análises clínicas desempenham um papel fundamental para compor a complexa história clínica de cada indivíduo, proporcionando dados imprescindíveis para controlo, diagnóstico e prognóstico de doenças, bem como para a monitorização terapêutica, contribuindo assim para manter uma boa qualidade de vida, e aumentando a expectativa média de vida, que tende a crescer conforme a ciência e a tecnologia avançam em prol da saúde e do futuro (1).

Todos os que atuam na saúde primária e/ou avançada, devem estar em constante evolução e atualização, compreendendo não só a atualização científica, mas também acompanhando a evolução cultural da sociedade, pois cada ser é único e merece atenção e cuidado. Atentando também ao vocabulário, pois se a mensagem transmitida não for compreendida, então fracassamos com o nosso dever de promover a saúde.

Funcionamento diário do Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Rodrigues, Lda.

Todos os dias, durante a manhã, está presente um técnico de análises clínicas ou um técnico superior de laboratório, que se responsabiliza por preparar todos os equipamentos, realizando o controlo de qualidade e avaliando os resultados dos controlos, baseando-se nas regras de *Westgard*, e se necessário, realiza a calibração dos equipamentos. Concomitante a isso, também faz as colheitas de sangue aos utentes que se dirigem à unidade central. O laboratório também possui postos de colheita, nomeadamente em Ançã, Ceira, Cernache, Castanheira de Pera, Pedrógão Grande e Pampilhosa da Serra.

Trata-se de um laboratório de pequeno porte, não havendo necessidade de divisão de setores, assim a equipa multidisciplinar tem competências para atuar na execução das técnicas e para usar todos os equipamentos.

Em julho de 2021, iniciei atividade profissional neste laboratório, como técnico de análises clínicas, executando a receção e recolha de dados dos utentes, colheita de produtos biológicos, processamento de amostras, processamento dos controlos de qualidade internos, calibração, inventário e encomenda de reagentes.

Fase pré-analítica

Para além das amostras colhidas no laboratório central, também processamos amostras advindas de postos de colheitas, onde os utentes se dirigem com as requisições médicas materializadas ou na forma de mensagem no telemóvel. Durante o atendimento, confirma-se o nome completo do utente, e solicita-se a data de nascimento, contacto telefónico e forma de receção do boletim de resultados. De seguida, essas informações são registadas no sistema informático através do *software* APOLLO da Confidentia, assim, sabem-se todos os parâmetros que devem ser avaliados. Quando o registo é iniciado, um número único e exclusivo é atribuído ao utente, assegurando-se que os resultados obtidos pertencem ao mesmo. Esse número é transformado em um código de barras, constituído por um prefixo, que são letras referentes ao posto de colheita de proveniência, o número do utente, e um sufixo correspondente ao setor para onde deve seguir a amostra. Na sala de colheitas, o técnico deve colar os códigos de barras nos respetivos tubos e frascos.

No momento da colheita, são respeitados os procedimentos de segurança e de qualidade, como o uso de material descartável (luvas, agulhas, algodão, seringas ou sistema a vácuo), a desinfecção do local da punção, o tempo de uso do garrote, não ultrapassando 1 minuto, pois pode alterar resultados relacionados com lise celular, (que se podem manifestar no doseamento do potássio e da lactato desidrogenase), a ordem dos tubos* (Figura 1) e o volume de amostra colhido para cada tubo de acordo com o recomendado pelo fabricante. Nos postos mais distantes, as amostras de soro são centrifugadas após a retração do coágulo, para dar mais estabilidade à amostra, até que esta seja transportada para o laboratório central. Quando as amostras chegam ao laboratório, são distribuídas pelos respetivos setores. As amostras que irão para o setor da Bioquímica/Imunologia são colhidas para tubos que contêm o ativador da coagulação e gel separador (Tabela 1), e para o setor da hemostase, as amostras são colhidas para tubos que contêm citrato de sódio (Tabela 1) sendo depois centrifugadas a 4.000 rpm (rotações por minuto), por 9 minutos, a 4°C (graus celsius). As amostras que irão para o setor da hematologia são colhidas para tubos que contêm sal de potássio do ácido etilenodiaminotetracético (K3EDTA) (Tabela 1), sendo homogeneizadas antes de serem analisadas.

*Já existem estudos que comprovam que a ordem dos tubos não representa alteração significativa na colheita por sistema a vácuo (2, 3 e 4). Os estudos que tratavam do erro na ordem da colheita foram feitos em 1977 (5) e em 1982 (6), eles relataram erros causados pela hipercaliemia e hipocaliemia, causada pela contaminação com EDTA, mas essa contaminação só ocorre em colheitas difíceis e em más condições, e tal não ocorre em colheitas bem-

sucedidas. Entretanto, até o momento desse relatório, é recomendado seguir as diretrizes da CLSI GP41 (*The Clinical & Laboratory Standards Institute*), que ainda se mantém no sentido de respeitar a correta ordem dos tubos.

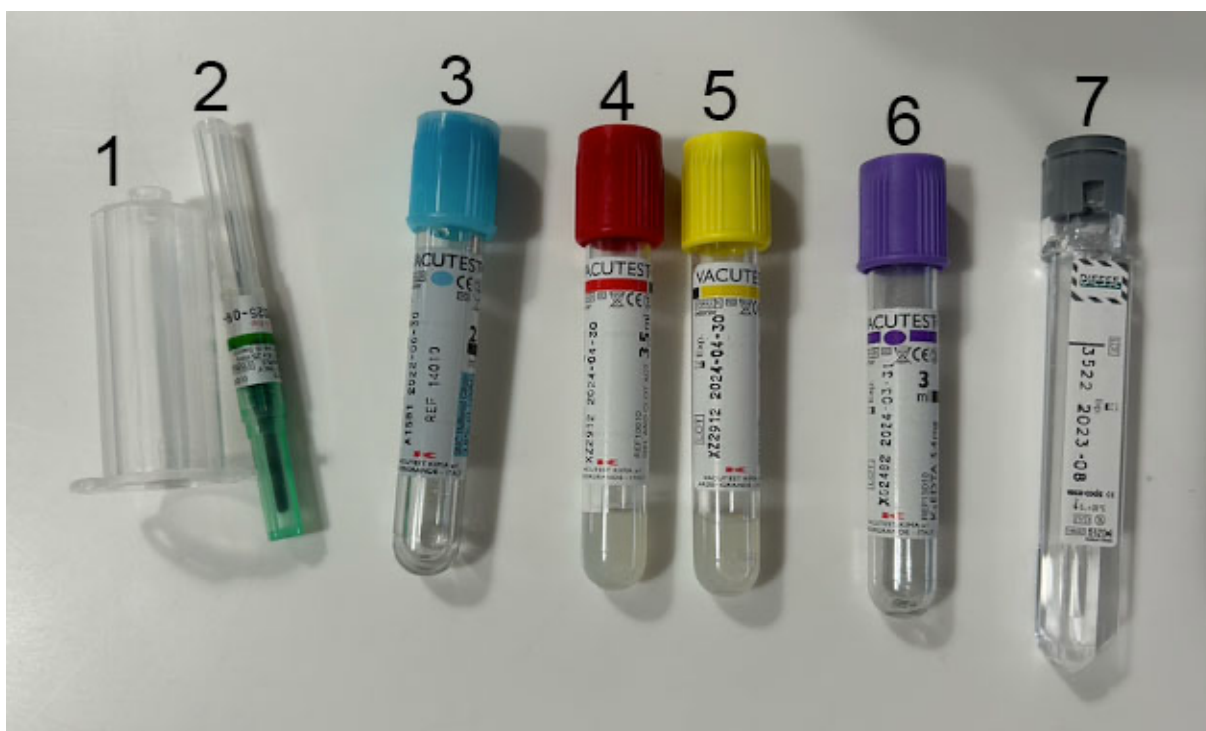


Figura 1. 1 - Suporte de utilização única (Holder); 2 - Agulha para sistema a vácuo; 3 - Tubo com citrato de sódio a 3,8%; 4 e 5 - Tubos com ativador de coágulo e gel separador; 6 - Tubo com EDTA K3; 7 - Tubo com 0,03mL de citrato de sódio.

Tabela 1. Apresentação da ordem da colheita, cores das tampas dos tubos, respectivos aditivos e sua aplicação

Ordem	Cor da tampa	Aditivo	Aplicação
1º	Azul	Citrato de sódio a 3,2%.	Plasma, após centrifugação. Provas de coagulação
2º	Roxo	EDTA K3	Sangue total. Hemograma e hemoglobina glicada (HbA1c)
3º	Vermelho e Amarelo	Ativador da coagulação e gel separador	Soro, após centrifugação. Bioquímica, Imunologia e Hormonologia
4º	Cinza	Citrato de sódio	Sangue total. Velocidade de Sedimentação

Fase analítica

Quando já está tudo registado, folhas de trabalho são impressas, para direccionar as amostras aos respetivos aparelhos, ou realizar técnicas manuais, ou alíquotar para envio para laboratório subcontratado.

A seguir a centrifugação, os tubos de soro e de plasma são distribuídos e colocados nos suportes dos respetivos analisadores, bem como os tubos de sangue total após homogeneização.

Toda e qualquer amostra que não cumpra com os requisitos exigidos, como ausência de identificação e amostras coaguladas quando se trata de sangue total para hemograma, são reportadas e eliminadas. Já os soros hemolisados, são utilizados para os parâmetros que não sofrem interferência ou reportados e descartados de imediato. A depender do caso, uma nova amostra é solicitada ao utente.

Fase pós analítica

A validação biopatológica é feita pela Dra. Luísa Frazão, farmacêutica especialista em Análises Clínicas, que tem como responsabilidade a integração fisiopatológica dos resultados analíticos, provenientes dos diversos setores, de acordo com a informação clínica fornecida. Após a validação, os boletins finais são emitidos e são entregues aos utentes, de forma impressa ou via e-mail.

I) Imunologia

A imunologia é a área da ciência que se dedica a estudar o sistema imunológico, associando toda a patofisiologia do sistema imunológico e analisando as suas características físicas e químicas (7).

Temos a imunidade inata ou natural, que é aquela que já nasce connosco, e se dá pela atuação de barreiras físicas (ex.: pele), químicas (ex.: ácido clorídrico no estômago) e biológicas (ex.: macrófagos), que agem de forma inespecífica, atuando como primeira linha de defesa. E também temos a imunidade adaptativa ou adquirida, atua de forma específica, e subdivide-se em:

- Imunidade ativa, que pode ser adquirida de forma natural ou induzida através de vacina;
- Imunidade passiva (8).

I.1) Testes de aglutinação

I.1.1) Título Antiestreptolisina O (tASO)

A estreptolisina O é uma exoenzima imunogénica tóxica, que é produzida por estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A, C e G. O seu doseamento tem utilidade no diagnóstico da febre reumática, doença inflamatória que afeta o tecido conjuntivo, da glomerulonefrite aguda, e de infeções por estreptococos.

O teste é qualitativo e semi-quantitativo, e é realizado por aglutinação em lâmina, através da incubação de partículas de látex revestidas com estreptolisina-O, com o soro do utente, sendo observada aglutinação se houver anticorpos antiestreptolisina O (ASO) no soro (9).

I.1.2) Fator Reumatoide

Trata-se de um grupo de autoanticorpos contra a porção Fc da imunoglobulina G. Apesar do fator reumatoide estar presente em diversas patologias, como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e síndrome de Sjögren, além de outras situações não reumáticas, desempenha um importante papel no diagnóstico da Artrite Reumatoide. O teste sérico para determinação do fator reumatoide é feito pela aglutinação em lâmina, detetando o analito de forma qualitativa e semi-quantitativa. Utilizam-se partículas de látex revestidas com gamaglobulina

humana, que aglutinam quando são incubadas com amostras positivas para o fator reumatoide (10).

1.1.3) RPR - *Rapid Plasm Reagin*

O *Treponema pallidum* é o agente causador da Sífilis, uma infecção sexualmente transmissível (IST). Essa bactéria causa lesões hepáticas e cardíacas, libertando fragmentos celulares. O sistema imunitário reage através da produção de anticorpos contra a cardioplipina, um componente intracelular, designando-se estes anticorpos por reaginas (11).

Trata-se de um teste de aglutinação em lâmina, para detecção de reaginas, através da incubação do soro do utente com partículas de carvão revestidas com cardioplipina (12).

É possível obter resposta qualitativa, resultado positivo (presença de aglutinação) ou resultado negativo (ausência de aglutinação). E também uma resposta semi-quantitativa, através de uma diluição seriada do soro do utente, ilustrada no caso clínico I.

Caso Clínico I

Foi realizado o teste RPR com uma amostra do soro de um utente, conforme solicitado pelo médico. Anamnese (entrevista clínica) desconhecida. O resultado revelou-se positivo. Diante disso, foi realizada uma diluição em série (Figura 2) para gerar um resultado semi-quantitativo - titulação - (Figura 3) e poder produzir uma informação mais completa para o médico.

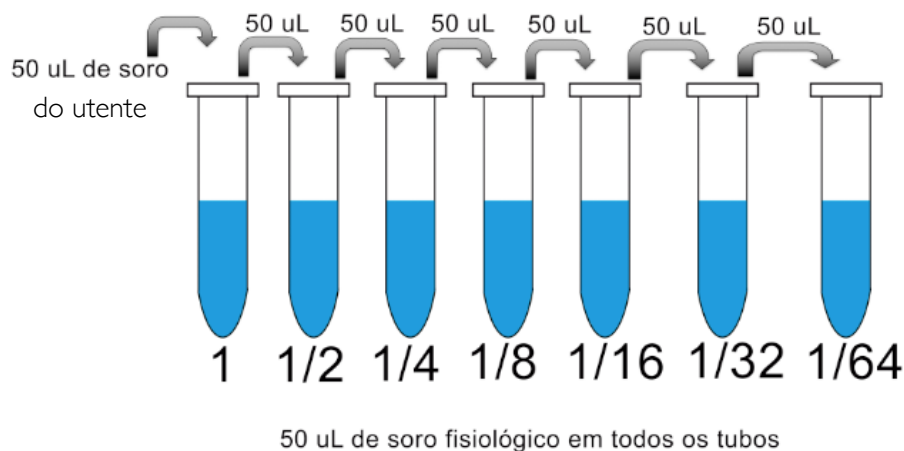


Figura 2. Diluição seriada do soro do utente, para realização da titulação do teste não treponémico.

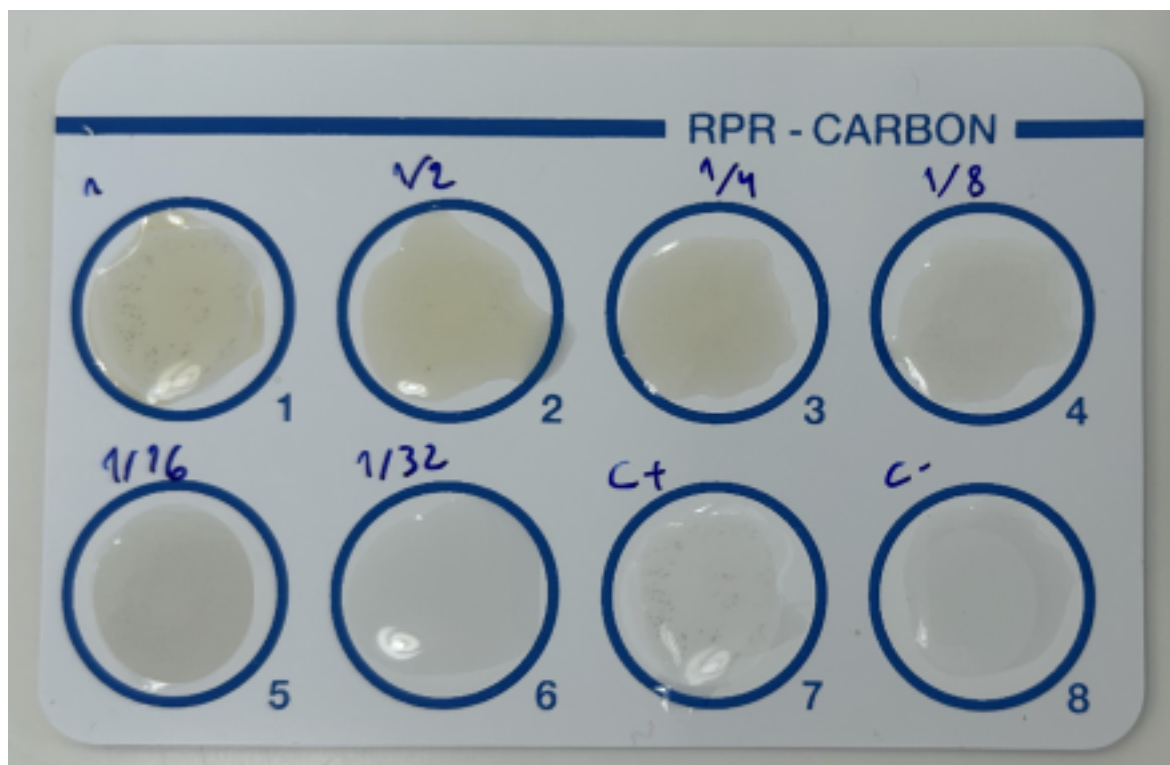


Figura 3. Círculo 1 - 50 uL de soro do utente + 20 uL de reagente RPR, revelando resultado qualitativo positivo; Círculos 2 a 6, contém diluição seriada + reagente RPR, revelando resultado semi-quantitativo positivo até a diluição 1/16, no círculo 5; Círculo 7 - Controlo Positivo; e Círculo 8 - Controlo Negativo.

1.1.4) Determinação do Grupo Sanguíneo e do Fator Rh

O grupo sanguíneo é determinado através da reação antigénio (Ag) - anticorpo (Ac). Tal determinação pode ser realizada através da prova globular, incubando soros padrão, onde há os anticorpos específicos, com uma alíquota de sangue total, onde, nos eritrócitos, há a presença ou não de antígenos, e será realizada a pesquisa da presença dos antígenos A (grupo A), B (grupo B), AB (grupo AB) ou da ausência dos mesmos (grupo 0). Os eritrócitos são classificados fenotipicamente como sendo de um grupo do sistema AB0 e, após pesquisa do antígeno D, são classificados como sendo fator Rh positivo (antígeno D presente) ou fator Rh negativo (na ausência do antígeno D). O grupo sanguíneo também pode ser determinado pela prova sérica, incubando o soro, onde há a presença de anticorpos naturais, com sangue total ou suspensão de eritrócitos padrão, onde há antígenos conhecidos, assim será realizada a pesquisa da presença dos anticorpos anti-A (grupo B), anti-B (grupo A), anti-A e anti-B (grupo 0), ou ausência de anticorpos (grupo AB), para além da pesquisa da presença de anticorpo anti-D, fator Rh positivo ou ausência de anticorpo anti-D, fator Rh negativo (Figura 4) (13).

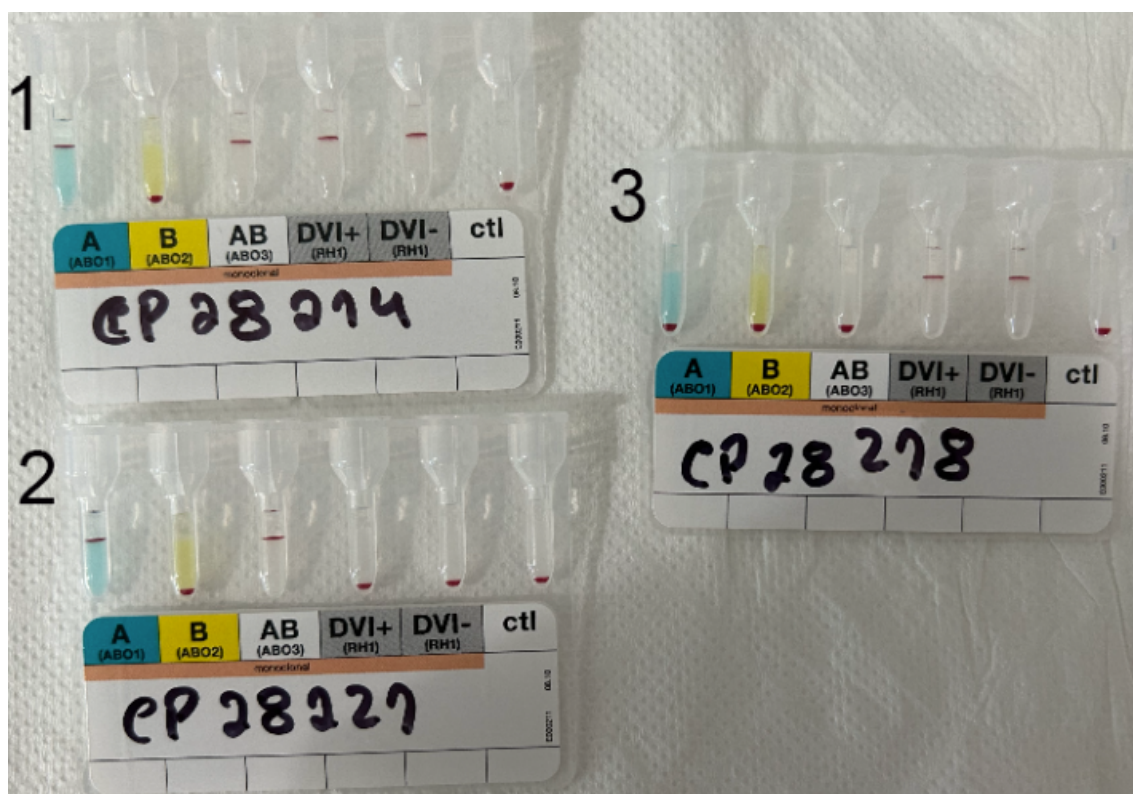


Figura 4. A prova globular é feita no ID-Card da DiaClon, onde A contém anticorpos anti-A, B contém anticorpos anti-B, AB contém anticorpos anti-A e anti-B, DVI+ e DVI- contém anticorpos para as variantes D, ctl é o controlo da reação e deve sempre ser negativo. Primeiro é feita a diluição de 50µL de sangue total em 500µL de diluente. Em seguida, é adicionado 10µL dessa suspensão, em cada poço, 10µL. Quando ocorre reação antígeno-anticorpo, forma-se um coágulo que fica retido na parte superior do gel, significando um resultado positivo. Quando essa reação não ocorre, os componentes sanguíneos atravessam o gel livremente e depositam-se na parte inferior do gel, significando um resultado negativo. 1 - Tipo sanguíneo A, fator Rh Positivo (A+); 2 - Tipo sanguíneo A, fator Rh negativo (A-); 3 - Tipo sanguíneo zero, fator Rh Positivo (0+).

1.1.5) Teste de *Coombs* direto e indireto

O teste de *Coombs* direto deteta a presença de anticorpos ligados aos eritrócitos. Faz-se a adição do soro de *Coombs* (com anticorpos anti-imunoglobulina humana) aos eritrócitos do utente, verificando se há aglutinação, que se traduz em resultado positivo, podendo ter vários significados clínicos, como uma reação hemolítica transfusional, doença hemolítica do recém-nascido, doença autoimune, ou reação secundária ao uso de medicamentos.

O teste de *Coombs* indireto deteta a presença de anticorpos anti-eritrocitários no soro do utente. Em cada poço do *card* (Figura 5 - B), já tem o soro de *Coombs* na matriz, e é adicionado soro do utente e eritrócitos padrão (Figura 5 - A), e fica a incubar por 15 minutos, a 37°C. Após a incubação, o *card* é centrifugado e, se for observada aglutinação na superfície da matriz, traduz-se em resultado positivo para anticorpos anti-eritrocitários, pois no soro do utente encontravam-se anticorpos contra hemácias. Este teste é bastante utilizado para o

rastreio de indivíduos que foram sensibilizados por antígenos de qualquer sistema sanguíneo, mas principalmente do sistema Rh. Para avaliar o risco de ocorrência da doença hemolítica do recém-nascido, este teste é realizado em gestantes de fator Rh desconhecido ou fator Rh negativo, assim verifica-se se há presença de anticorpos anti-D (14).

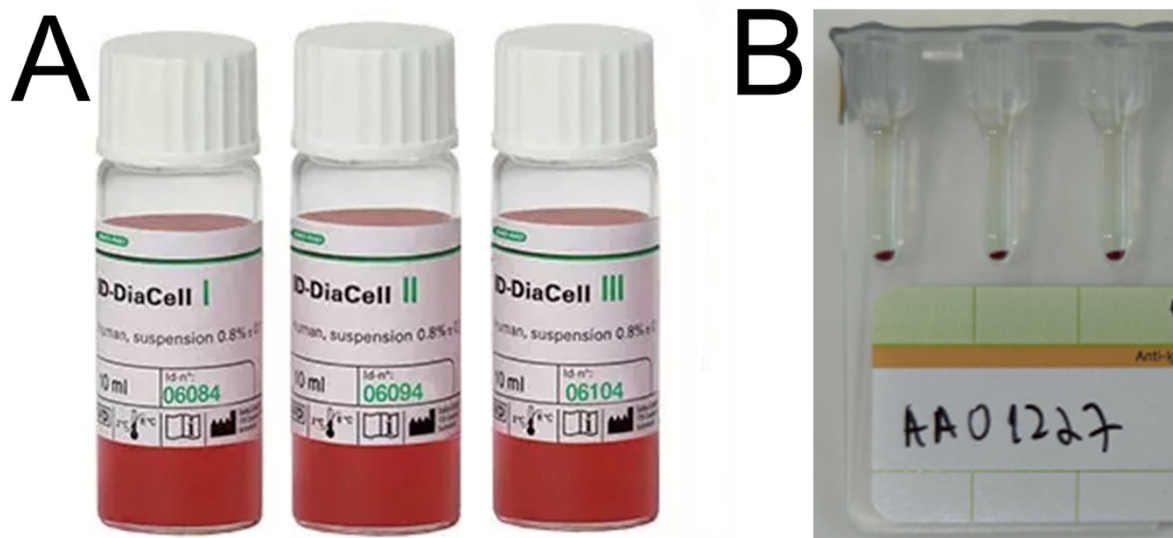


Figura 5. A - Reagentes para reação de *Coombs* indireto, fornecido pela Bio-Rad Portugal; B - card do teste de *Coombs* indireto, com resultado negativo.

1.2) Imunocromatografia

1.2.1) Teste Imunológico de Gravidez (TIG)

O teste rápido é realizado através da imunocromatografia de fluxo lateral que permite detetar a presença de hCG na urina e no soro a partir do sétimo dia após ter ocorrido a fecundação. Os níveis de hCG aumentam progressivamente até atingir um pico por volta da décima segunda semana de gravidez.

A casete do teste por Imunocromatografia de fluxo lateral utiliza anticorpos monoclonais anti-hCG imobilizados na linha de teste da membrana, e na linha controlo há anticorpos anti-imunoglobulinas de rato. Conforme a amostra migra na membrana do teste, a região do controlo sempre tem de revelar positividade, validando a eficácia do teste, pois há anticorpos anti-rato (porque os anticorpos monoclonais foram purificados no soro de rato). Na região teste há anticorpos monoclonais anti-hCG imobilizados, se houver hCG na amostra, irá reagir com os anticorpos monoclonais anti-hCG conjugados com partículas coloridas, gerando uma linha vermelha, representando o resultado positivo. Em caso de negativo, nenhuma linha irá surgir na região teste (Figura 6) (15).

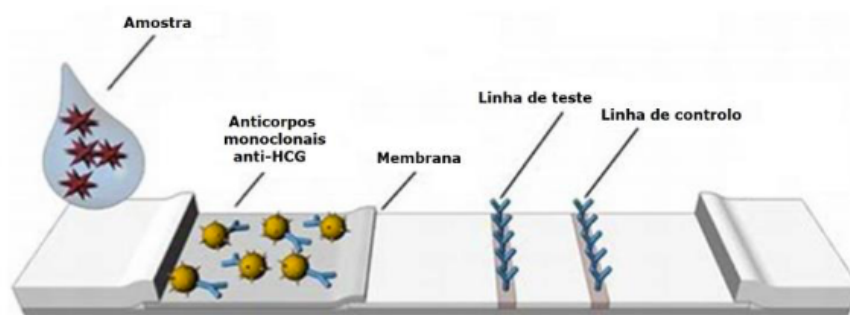


Figura 6. Representação da Imunocromatografia de fluxo lateral, expondo a membrana, a amostra com antígenos e os anticorpos necessários para realizar o procedimento (16).

1.2.2) Toxicologia

No laboratório também fazem a pesquisa na urina de drogas de abuso, através de testes rápidos qualitativos, por imunocromatografia de fluxo lateral, onde é possível detectar tetrahydrocannabinol (THC), morfina/opiáceos, cocaína e cotinina.

1.2.3) SARS-CoV-2 Ag (Teste rápido)

O teste rápido de diagnóstico da COVID-19, utiliza como técnica a imunocromatografia de fluxo lateral, que deteta qualitativamente a proteína de nucleocápside (N) do vírus, pois tem na cassete uma membrana de nitrocelulose com anticorpo conjugado com ouro coloidal que reconhece este antígeno. A zona C, foi pré-revestida com anticorpos de cabra anti-IgY de galinha, como controle, esta sempre deve revelar a cor vermelha, indicando a qualidade do teste. A zona do teste, T, foi pré-revestida com anticorpos anti-SARS-CoV-2, forma-se um imunocomplexo e revela a cor vermelha para positivo, e ausência de cor para negativo (17).

Caso Clínico 2

Utente, com 25 anos, do sexo masculino, deslocou-se ao laboratório para realizar um teste de antígeno SARS-CoV-2. O mesmo declarou não ter sintomas associados a COVID-19, mas relatou ter tido contato com casos positivos há 3 dias, e decidiu fazer o teste. O resultado revelou-se negativo, conforme cassete exposta na Figura 7 - A.

Caso Clínico 3

Utente, com 28 anos, do sexo feminino, foi até um posto de colheita e solicitou a realização de um teste de antígeno SARS-CoV-2. Relatou pirexia (febre), cefaleias (dor de cabeça) e mialgia (dor muscular) generalizada. Relatou ter se exposto a riscos, ao não usar máscara numa reunião com colegas da faculdade, mas não saber se teve contato com algum

caso positivo para COVID-19. O resultado revelou-se positivo, conforme cassete exposta na Figura 7 - B.



Figura 7. Cassete de teste rápido para SARS-CoV-2, onde C significa controlo e deve sempre surgir a linha vermelha, indicando a boa qualidade do teste. A região T quando o teste é negativo não apresenta linha vermelha, e quando o teste é positivo, apresenta a linha vermelha. A - Resultado negativo; B - Resultado positivo.

1.3) Reações automatizadas

Os equipamentos Beckman Coulter Dxl 600 (Figura 8) e o Vidas (Figura 9), realizam imunoenaios, tendo como base principal a reação antígeno e anticorpo, e são utilizados no doseamento das hormonas, dos anticorpos e dos marcadores tumorais. O laboratório utiliza apenas amostras de soro, mas o equipamento também realiza reações com plasma heparinizado.

O equipamento Beckman Coulter DXI 600 utiliza com técnica o imunoenasiao por quimioluminescência (CLIA).

Em cada poço de reação, onde ocorre a incubação, lavagem e a emissão de sinal, é adicionada uma partícula paramagnética revestida com anticorpos específicos adsorvidos à superfície, que atuam como fase sólida. A amostra é incubada com um segundo anticorpo marcado por uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano). O complexo antígeno-anticorpo é separado da partícula paramagnética, e outros componentes da amostra, como os anticorpos não ligados com antígenos, ficam acumulados numa câmara superior do tubo. São feitas lavagens sucessivas, assegurando que não reste fração não ligada. É adicionado um

substrato quimioluminescente, que vai reagir com a enzima ligada ao anticorpo, promovendo emissão de luz. Dessa forma é possível fazer sua quantificação, pois um luminômetro deteta a intensidade de luz emitida, convertendo o resultado calculado baseando-se numa curva padrão, gerando o valor em concentração (18).

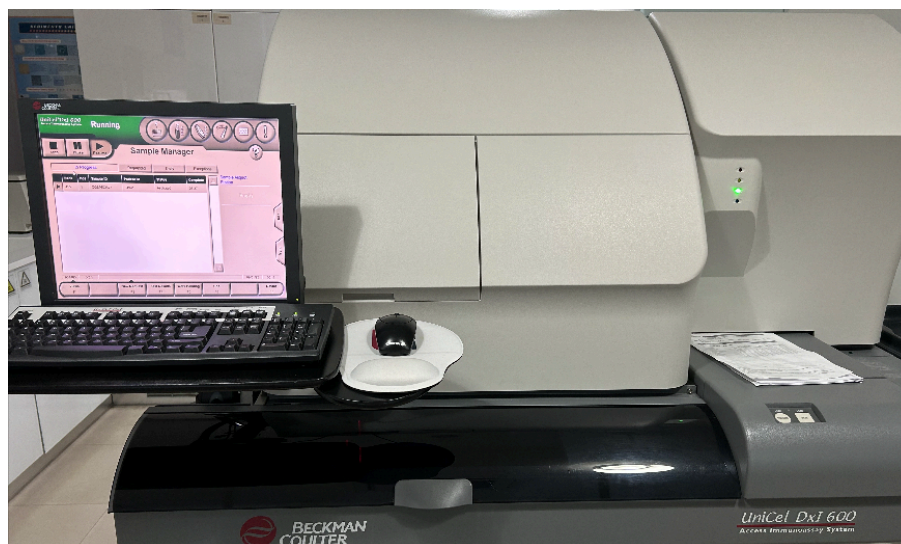


Figura 8. Aparelho Beckman-Coulter UniCel DxI 600, utilizado na determinação de TSH, PSA total e livre, T4 livre, T3 total e livre, LH, FSH, Estradiol, Prolactina, Vitamina D, Vitamina B12 e Ácido Fólico.

O equipamento Biomérieux Vidas, utiliza como técnica o ensaio imunoenzimático por fluorescência (ELFA). Primeiro executam-se as duas etapas do método *sandwich* e depois faz-se a detecção final por fluorescência.

As reações ocorrem dentro de recetáculos ou cones (fase sólida), e nas fitas ou barretes contém os poços com os diversos reagentes necessários para cada reação. Esse método utiliza a enzima fosfatase alcalina e o substrato é o 4-Metil-Umberiferil fosfato (4-MUP) hidrolisado em 4-metil-umbeliferona, o qual gera fluorescência aos 450nm, após excitação aos 350nm (19).

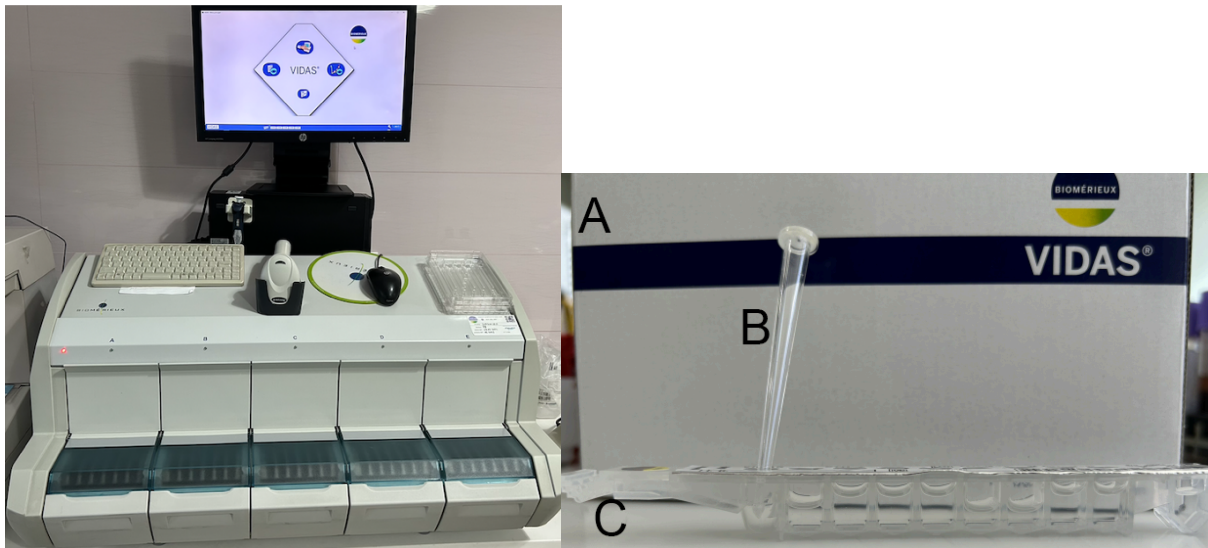


Figura 9. Aparelho Biomérieux Vidas, onde realiza-se a determinação de Testosterona total, CEA, Ca 19-9, Ca 125, AFP, HCG, Cortisol, dentre outras determinações, com base nos princípios ELFA - *Enzyme Linked Fluorescence Immunoassay*. A - Embalagem do fornecedor; B - Cone ou Recetáculo; C - Barrete ou Fita com os reagents necessários.

1.3.1) Toxoplasmose

A toxoplasmose consiste numa doença parasitária, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Uma pequena percentagem de indivíduos desenvolve problemas de visão e os indivíduos imunodeprimidos podem desenvolver sintomas graves. Nas mulheres gestantes, dependendo do período de gestação, a infeção pode ter consequências graves e determinar o sucesso ou não da gestação. Mulheres que se infetam antes da gestação adquirem imunidade, o que diminui o risco numa futura gravidez. Se a infeção se der durante a gestação ou logo antes da gestação, não há tempo para desenvolvimento de imunidade e poderá haver transmissão do parasita para o feto (transmissão congénita), quanto mais recente for a gestação, maiores são os riscos para o feto.

A infeção se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados presentes nas fezes dos gatos, ou outros felídeos, ou pela ingestão de carnes cruas ou malpassadas contaminadas com cistos do protozoário (20).

Pesquisa de Imunoglobulina G (IgG) de *T. gondii*

A técnica é realizada através da pesquisa de anticorpos na amostra, neste caso, soro. O soro é diluído e adicionado no poço de reações da barrete, e de seguida é aspirado para dentro do cone, onde foram sensibilizados antígenos de *T. gondii*. Em seguida, é aspirado um anticorpo monoclonal (Ac de rato anti-IgG humano), conjugado com uma enzima (fosfatase alcalina), que irá ligar-se a quaisquer IgG humana fixadas na parede do cone. Na etapa final, o

substrato (4-metil-umbeliferil) é aspirado. A enzima do conjugado catalisa a hidrólise deste substrato num produto final fluorescente (fosfato de 4-metil-umbeliferona), cuja fluorescência é medida a 450nm. O valor do sinal fluorescente é proporcional à concentração de anticorpos ligados aos antígenos *T. gondii*. A cada etapa ocorre uma lavagem, para dispensar os componentes não ligados. Por fim, o aparelho calcula o resultado com base na curva de calibração, executada previamente (21).

Pesquisa de Imunoglobulina M (IgM) de *T. gondii*

O soro é diluído e adicionado no poço de reações da barrete, e de seguida é aspirado para dentro do cone, onde foram sensibilizados anticorpos policlonais. Se houver a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, estes serão detetados pelos antígenos específicos de *T. gondii* inativados, e revelado por um anticorpo monoclonal de murino anti-toxoplasma, marcado com a enzima fosfatase alcalina. A etapa da enzima e da fluorescência é igual a da IgG (22).

Valores de referência:

IgG

Negativo: Inferior a 1.60 UA/mL

Indeterminado: de 1.60 a 6.0 UA/mL

Positivo: Superior a 6.0 UA/mL

IgM

Negativo: Inferior a 0.50 UA/mL

Indeterminado: de 0.50 a 0.59 UA/mL

Positivo: Superior a 0.59 UA/mL

	IgM	IgG	Significado
Resultado 1ª Colheita	-	-	Ausência de infeção
Resultado 1ª Colheita	-	+	Infeção relativamente antiga (imunidade) ou Primo-infeção sem IgM
Resultado 2ª Colheita	-	Estáveis	Imunidade
Resultado 1ª Colheita	-	+	Necessário realizar uma segunda colheita
Resultado 2ª Colheita	-	Aumentadas	Primo-infeção sem IgM, faz-se teste de Aidez (IgG)
			Se Aidez forte, infeção ocorreu há mais de 4 meses
			Se aidez fraca/intermédia, não se pode excluir infeção recorrente, consulta de alto risco
Resultado 1ª Colheita	+	-	Necessário realizar uma segunda colheita
Resultado 2ª Colheita	+	-	Infeção não específica
Resultado 2ª Colheita	+	+	Primo-infeção, consulta de alto risco
Resultado 1ª Colheita	+	+	Faz-se teste da Aidez (IgG)
			Se Aidez forte, infeção ocorreu há mais de 4 meses
			Se aidez fraca/intermédia, não se pode excluir infeção recorrente, consulta de alto risco

Figura 10. Imagem produzida em formato de tabela, com base nos dados lecionados na cadeira de parasitologia, acerca do diagnóstico da toxoplasmose em gestantes, e com base na literatura (23).

Caso Clínico 4

Chegou ao laboratório uma utente, com 35 anos de idade, proveniente do médico de família, com requisição médica para realização de análises clínicas num contexto pré-concepcional. Foram pedidos diversos parâmetros, adequados ao perfil, e todos os resultados foram validados como dentro da normalidade, com exceção do que relato a seguir:

Análise das imunoglobulinas no contexto da toxoplasmose

Resultado da 1^o colheita:

IgM Positivo (1.76 UA/mL)

IgG Negativo

Conforme a rotina laboratorial, é necessário realizar a repetição da análise. A amostra foi recentrifugada e submetida a reanálise, pois como o índice foi relativamente baixo, pode ser devido a reação não específica.

Resultado da repetição:

IgM Não reativo

Conforme resultado da repetição, atribuiu-se a que, por vezes, as grávidas desenvolvem IgM's inespecíficas, e que após a recentrifugação do tubo com soro, o resultado já dê negativo. Se esse valor se mantiver positivo, a médica da utente é de imediato avisada para agir em conformidade.

Caso Clínico 5

Chegou ao laboratório uma utente, com 41 anos de idade, proveniente de um médico de um hospital privado, com requisição médica para realização de análises clínicas num contexto pré-concepcional. Todos os parâmetros analisados obtiveram resultado satisfatório, considerados dentro da normalidade, exceto o resultado das imunoglobulinas no contexto da toxoplasmose, abaixo:

Resultado da 1^o colheita:

IgM Negativo

IgG Positivo 37 UA/mL

O ideal seria realizar uma 2^a colheita (23), para que fosse observado o perfil comportamental das imunoglobulinas G. Se IgG se apresentar estável, trata-se de uma

imunidade já relativamente antiga. Se IgG se apresentar aumentada, pode se tratar de uma primo-infecção sem IgM, sendo assim deve ser realizado o teste de avidéz, para diferenciar se estamos diante de uma avidéz forte (infecção ocorreu há mais de 4 meses), de uma fraca ou intermédia (não podendo descartar infecção recorrente). Por se tratar de um laboratório privado, só é executado aquilo que o médico prescreve na credencial, portanto, se após analisar os resultados, o clínico achar que deve, ele prescreve a credencial para repetição.

1.3.2) Imunoglobulina E (IgE) total

A determinação da IgE total, feita no equipamento Beckman-Coulter AU480, tem lugar na avaliação de alterações respiratórias e cutâneas de origem possivelmente alérgica (24). Porém, é um teste não específico, pois o seu aumento não significa se tratar de uma reação alérgica, pois há fatores que influenciam no seu resultado, como idade, sexo, histórico familiar, hábito tabagista, além de poder estar presente em uma grande variedade de patologias (25), como parasitose intestinal ou cutânea, mieloma, doenças infecciosas (aspergilose e filariose pulmonares), imunodeficiências primárias, entre outras (24). Contudo, muitos indivíduos com alergias apresentam valores séricos dentro do intervalo de referência. Apesar destas limitações, a determinação de IgE tem um bom papel no rastreio das alergias (26).

2) Técnicas Manuais

2.1) Espermograma

Pretende avaliar a capacidade produtiva de espermatozoides viáveis, de forma qualitativa e quantitativamente. Também pode ser feito para comprovar eficácia de uma vasectomia.

Após abstinência sexual total de 3 a 5 dias, o utente dirige-se ao laboratório central, e faz a colheita da amostra, através de masturbação. Após a colheita, a amostra é imediatamente alocada na estufa a 37°C. A análise é feita em 2 etapas:

- Macroscópica - avalia o volume, o pH e o tempo de liquefação.
- Microscópica - Após 30 minutos de incubação na estufa a 37°C, é feita a diluição de uma alíquota da amostra com soro fisiológico de 20:1, introduz-se a diluição na Câmara de *Neubauer*, onde visualiza-se os espermatozoides móveis e calcula-se a percentagem, o tipo de mobilidade e o número de células presentes. Volta a ficar incubado na estufa a 37°C, por 3h30min. Ao fim desse tempo, é feita uma nova contagem de espermatozoides móveis. Aplica-

se a fórmula $N = C \times 20 \times 10^4$, onde N é o número total de espermatozoide por mililitro, e C é a média ponderada da contagem em 4 quadrantes de 1 milímetro. Também é avaliada a morfologia, através do preparo de uma lâmina com amostra sem diluir, cora-se o esfregaço com *Giemsa* por 15 minutos, e observa-se ao microscópio ótico, com ampliação de 1000x (imersão), onde os espermatozoides estarão corados num tom azul, e a morfologia das cabeças é observada (27).

3) Hemostase

O controlo da hemostase, realizado no equipamento ACL 9000 (Figura 11), é utilizado principalmente para o controlo terapêutico dos anticoagulantes via oral, tomados por utentes com risco elevado ou histórico de doenças cardíacas, nomeadamente relacionadas com enfarte ou processos trombóticos.



Figura 11. Aparelho ACL9000, utilizado para realizar os ensaios de Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa) e Fibrinogénio.

3.1) Tempo de Protrombina (TP)

O TP avalia a ação dos fatores da coagulação das vias extrínseca e comum. É também sensível a fatores dependentes da vitamina K (Fator II (Protrombina), Fator VII, Fator IX e Fator X), por esse motivo, utiliza-se para monitorizar terapêuticas com fármacos antagonistas da Vitamina K, pelo cálculo e análise do INR (*International Normalized Ratio*) (28).

Através do teste de tempo de Protrombina, é medido o tempo de conversão do fibrinogénio em fibrina (formação de coágulo) numa amostra de plasma citratado, que deverá

ocorrer em segundos. O teste é feito através da adição de uma tromboplastina (equivalente à tromboplastina tecidular) no plasma citratado do utente e é incubado durante alguns minutos, após o qual o plasma é recalcificado pela adição de cloreto de cálcio em excesso. Nestas condições, através de leitura ótica, mede-se o tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina e o resultado traduzirá no tempo de protrombina (29).

3.2) Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa)

Na realização do ensaio para determinação do Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa), ao plasma citratado, são adicionados ativadores da via intrínseca, sílica e fosfolípidos, para dar início à fase de contato. A seguir à ativação, adiciona-se cloreto de cálcio, para dar início à cascata de coagulação que leva à formação de trombina, tendo como resultado final o coágulo. Esse teste avalia os fatores da coagulação das Vias Intrínsecas e Comum, sendo sensível à carência de fatores dessas vias (Fatores II, V, VIII, IX, X, XI, XII e Fibrinogénio) (29).

3.3) Fibrinogénio

O Fibrinogénio (Fator I), é uma glicoproteína essencial para a formação de fibrina. A conversão de fibrinogénio em fibrina, depende de trombina. A medição da formação de fibrina é feita em segundos, e começa a contar o tempo desde a adição de trombina em excesso até a formação de fibrina, que é feita através de leitura ótica. Esta determinação tem importância na avaliação do risco trombótico e da gravidade das patologias associadas (30).

4) Microbiologia

4.1) Bacteriologia

Neste setor ocorre a análise de diversos produtos biológicos, para a identificação de microrganismos patogénicos e a sua suscetibilidade a antibióticos. As amostras mais comuns são urina, fezes e exsudatos purulentos, vaginais, uretrais e retais. Todas as colheitas, sementeiras e provas devem ser feitas seguindo os devidos protocolos, evitando assim possíveis contaminações e resultados equívocos.

4.1.1) Coloração de Gram

Essa técnica (Figura 12) foi desenvolvida no ano 1884, pelo bacteriologista Hans Christian Gram, utilizando quatro reagentes (Figura 13). Esse método permite separar as bactérias em 2 grandes grupos, as bactérias Gram positivas e Gram negativas. Essa distinção é de suma importância, pois a composição das paredes desses 2 grandes grupos é essencial no processo de coloração. As bactérias Gram positivas têm a parede composta uma membrana

plasmática, e uma espessa camada de peptidoglicanos, ao qual se ligam os ácidos teicóicos e os ácidos lipoteicóicos, após a coloração, apresentam-se em tom azul/violeta. As bactérias Gram negativas têm a parede mais complexa, composta por uma membrana plasmática, uma fina camada de peptidoglicanos e uma membrana externa formada por uma bicamada fosfolipídica e uma camada de lipopolissacarídeos (LPS) (Figura 14), após a coloração, apresentam-se em tom vermelho (31).

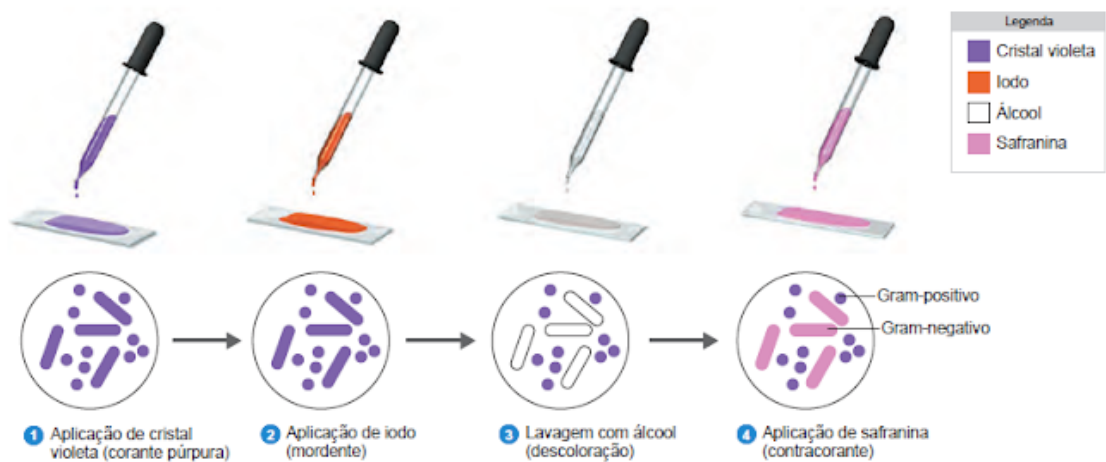


Figura 12. Representação do procedimento de coloração de Gram (31).

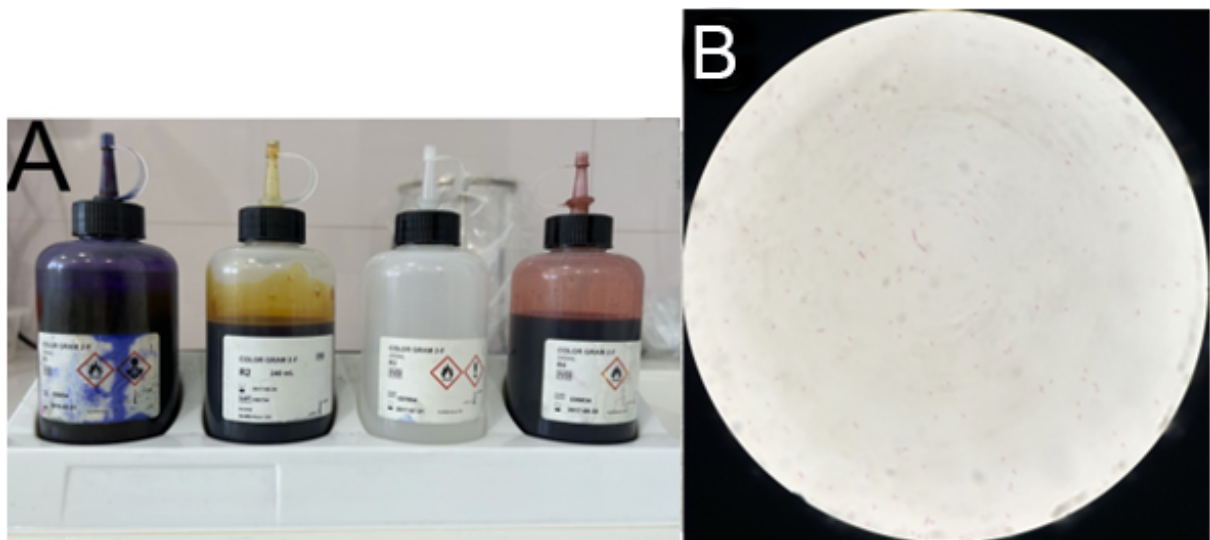


Figura 13. A - Reagentes para coloração de Gram; B - Visualização por microscópio óptico, ampliação de 1000x, com óleo de imersão, de bacilos Gram negativos e de cocos Gram positivos.

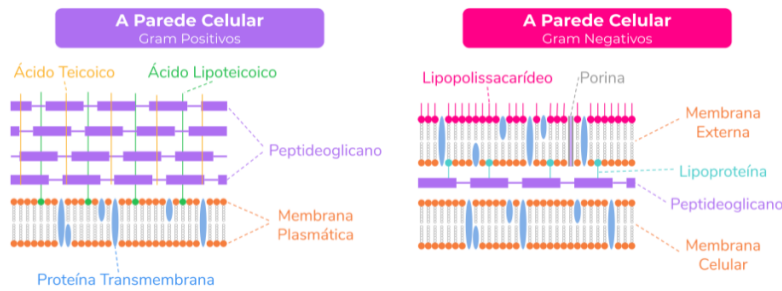


Figura 14. Ilustração das paredes bacterianas Gram positiva e Gram negativa (32).

4.1.2) Cultura de produtos em meios cromogénicos e antibiograma

Para realizar as uroculturas, o laboratório utiliza o meio cromogéneo chromID® CPS® Elite (CPSE), fornecido pela Biomérieux. A urina do utente é semeada nesta gelose e incubada a 37°C, entre 18 a 24 horas. É um bom meio de isolamento e identificação presuntiva, de forma fiável, através das características das colónias formadas, seja pela cor, brilho ou tamanho. É um meio diferencial e não seletivo, composto por várias peptonas e substratos cromogénicos que permitem a deteção de atividade enzimática específica, assim cada bactéria adquire uma cor específica. Esta gelose também contém L-triptofano, um substrato que é convertido, por certas bactérias, em água e indol, como a *E. coli*, que tem a capacidade de converter o aminoácido triptofano em indol, através da enzima triptofanase, dando origem ao tom roxo acastanhado (33).

A seguir a incubação, com a presença de crescimento bacteriano, é feita a identificação presuntiva das colónias e em seguida é feito o antibiograma na respetiva galeria (Figura 15), que é incubada a 37°C, entre 18 a 24 horas. Após incubação, a galeria é lida no Mini API, um equipamento que faz a leitura das galerias com base na turbidez dos diferentes poços e revela os resultados como suscetíveis, resistentes ou intermédios, para os diferentes antibióticos.

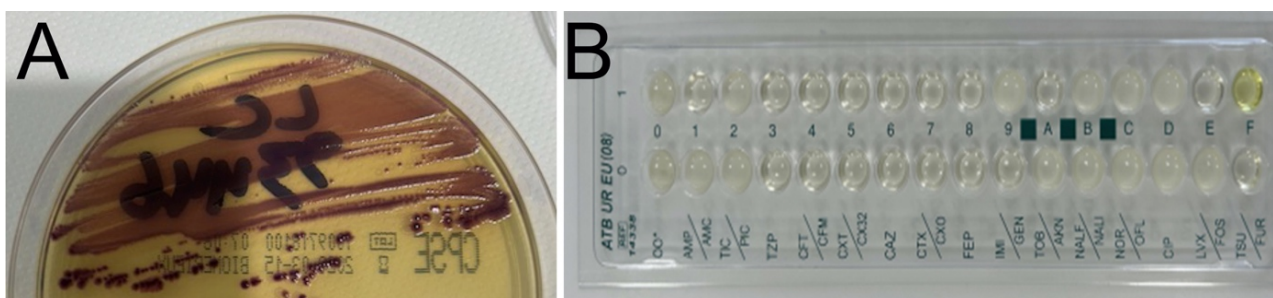


Figura 15. A - Observação de colónias de *Escherichia coli*, em meio chromID® CPS® Elite (CPSE), identificadas pelo tom castanho arroxeado; B - Galeria de antibiograma, fornecida pela Biomérieux, para teste de suscetibilidade aos antibióticos.

4.2) Urina

4.2.1) Análise Sumária da Urina (Urina II)

A análise sumária de urina subdivide-se em 2 partes:

A análise físico-química, usando urina não centrifugada, utilizando o equipamento Aution Max AX-4280 (Figura 16), para avaliar aspecto/cor, pH, densidade, a presença ou ausência de proteínas, glicose, bilirrubina, urobilinogénio, cetonas, nitritos. E a análise do sedimento (Figura 17, 18), usando urina centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos, observando através do microscópio ótico, ampliação de 400x (Figura 19), pesquisando visualmente a presença ou ausência de leucócitos, cilindros, cristais, células epiteliais, eritrócitos e outros elementos figurados.



Figura 16. Aparelho Aution Max AX-4280, onde realiza-se a análise físico-química da urina.

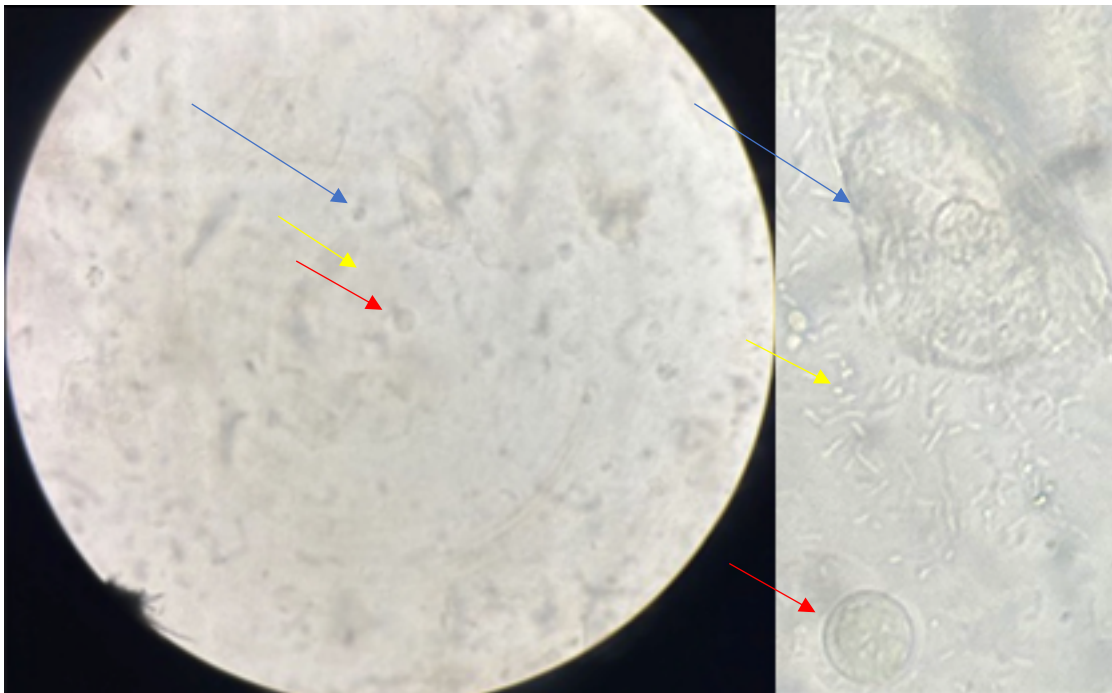


Figura 17. Lâmina de sedimento urinário, observadas ao microscópio ótico, aumento 400x. É possível observar bacteriúria (seta amarela), leucócitos (seta vermelha) e células epiteliais (seta azul).

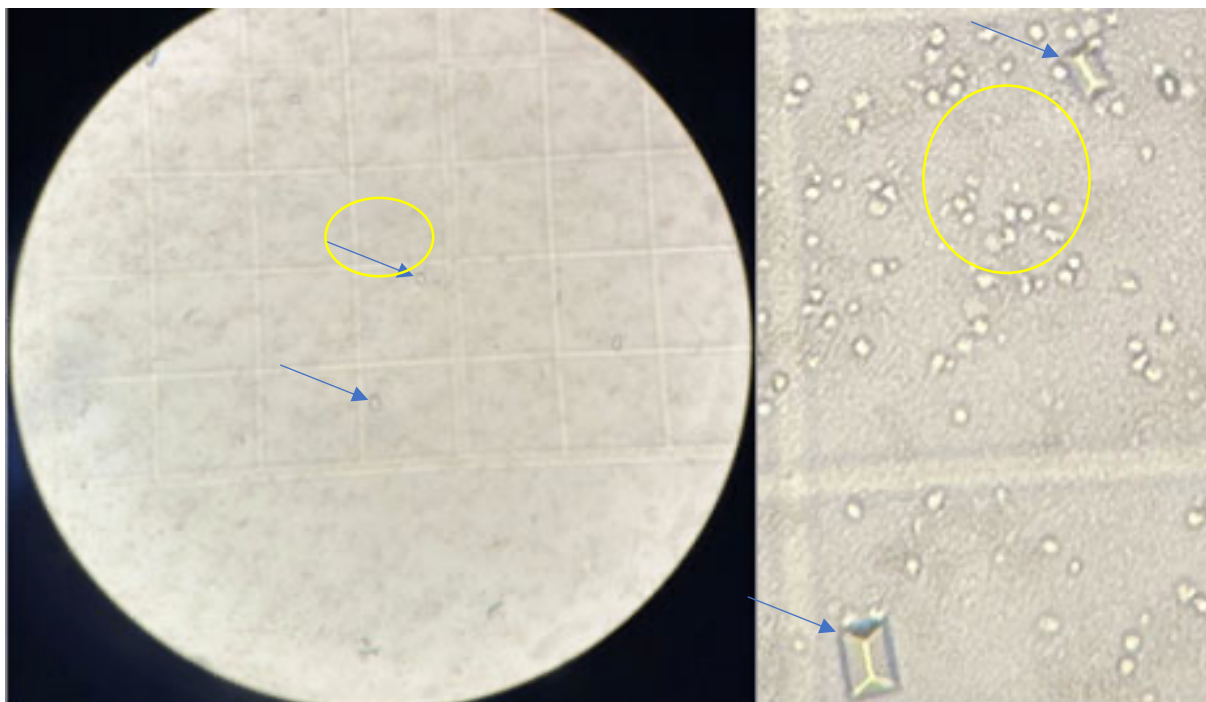


Figura 18. Lâmina de sedimento urinário, observadas ao microscópio ótico, ampliação de 400x. É possível observar bacteriúria (círculo amarelo), e cristais trifosfato (seta azul).

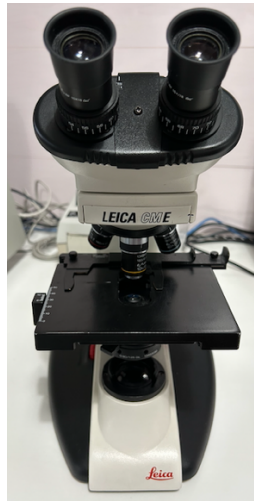


Figura 19. Microscópio da marca LEICA, Modelo I 349521X, utilizado para diversas técnicas.

4.3) Micologia

No laboratório, realiza-se a sementeira das amostras, no meio cromogénico Sabouraud (SGC2), cândida (CAN), e nos meios Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol e Sabouraud Cloranfenicol Actidiona. Se houver crescimento, o meio é enviado para um laboratório subcontratado, em Espanha, onde é realizada a identificação do fungo e suscetibilidade aos antifúngicos.

4.4) Fezes

As análises às fezes também são muito solicitadas pelos médicos, seja para pesquisa de sangue oculto, seja para coprocultura ou pesquisa de microrganismos. Tais pesquisas auxiliam no diagnóstico do caso clínico apresentado ao clínico, direcionando para o tratamento adequado.

4.4.1) Parasitologia

O exame parasitológico de fezes é realizado com base no método de Ritchie. Tem como objetivo permitir a identificação da presença de parasitas nas fezes, estejam eles na forma de quistos, ovos, ou larvas, no sedimento final.

4.4.2) Coprocultura

A pesquisa por bactérias patogénicas nas fezes tem lugar no diagnóstico de infeções causadas por *Salmonella* e *Shigella*. Estima-se que enquanto a *E. coli* está presente em torno de 10^9 por grama de fezes, a *Salmonella* e a *Shigella*, se presentes, estão em um número muito

menor, em torno de 200 por grama, quantidade já patogénica. Por esse motivo, é necessário realizar o enriquecimento da matéria fecal, com um caldo capaz de recuperar essa pequena quantidade de bactérias patogénicas e inibir o crescimento de *E. coli* e de outros microrganismos entéricos. No laboratório, é utilizado o Caldo Selenito (Figura 20), fornecido pela Biomérieux, num momento pré sementeira em meio sólido, onde é feita a incubação por 8 a 12 horas, a 37°C. Esse caldo possui citrato e desoxicolato de sódio, que impedem o crescimento da microbiota intestinal normal e possibilitando a multiplicação dos reais enteropatógenos (*Salmonella* e *Shigella*) (34). Após o enriquecimento, é realizada a sementeira nos meios Hektoen e *Salmonella*, também fornecidos pela Biomérieux, e incuba-se por 24 horas, a 37°C. O meio *Salmonella* é seletivo, diferencial e cromogénico, composto pelo substrato cromogénico para a B-galactosidase, metabolizado por outras enterobactérias não patogénicas, revelando colónias na cor verde-azulado, e o ácido glucorónico, metabolizado pela *Salmonella*, revelando colónias na cor malva. O meio Hektoen é seletivo e diferencial, contendo sais biliares, capazes de inibir o crescimento de microrganismos Gram positivo, e também carácter tóxico para alguns microrganismos Gram negativos, inibindo ou retardando seu crescimento. A presença de lactose, sacarose, salicino e dos indicadores de pH azul de bromotimol e fucsina ácida, permite diferenciar os microrganismos entéricos, pela cor das colónias e da gelose. *Salmonella* e *Shigella*, que são não fermentadores da lactose, não alteram a cor da gelose, já os fermentadores acidificam o meio, alterando o pH e mudando a cor do meio para laranja (35).

Todas as placas semeadas, durante a elaboração deste relatório, tiveram resultado negativo.

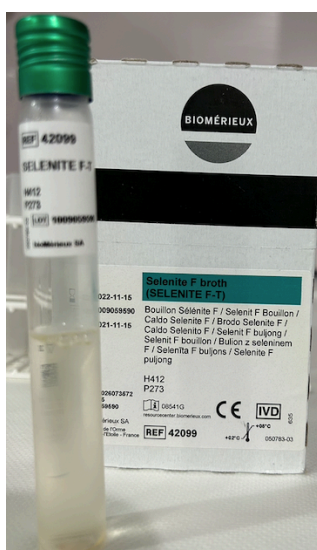


Figura 20. Caldo selenito, um meio de enriquecimento, pois possui citrato e desoxicolato de sódio, que impedem o crescimento da microbiota intestinal normal e possibilita a multiplicação dos reais enteropatógenos (*Salmonella* e *Shigella*).

5) Setor de Biologia Molecular

Este setor foi implementado no laboratório em 2020, em decorrência da necessidade de resposta rápida ao surgimento da então desconhecida e nova doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, que atingia milhares de pessoas, a nível global. Todos os esforços do setor da saúde foram direcionados para detetar, compreender e minimizar os efeitos de tal moléstia, assim era possível isolar e cuidar dos utentes positivos e tentar evitar ainda mais a propagação, e também conseguir tempo para que fosse desenvolvida uma vacina eficaz.

O coronavírus, causador da SARS-CoV-2, é um vírus envelopado de RNA cadeia simples positiva (+ssRNA), e de acordo com a classificação de Baltimore (Figura 21), pertence ao Grupo IV, e tem aproximadamente 30kb, sendo o maior genoma viral conhecido até a data. Seu material genético atua como RNA mensageiro (mRNA) no interior da célula hospedeira, produzindo proteínas virais (tradução). Sua replicação se dá no citoplasma, primeiro ocorre a produção da cadeia complementar (-ssRNA) e essa é utilizada como molde para sintetizar o genoma viral (transcrição) (36, 37).

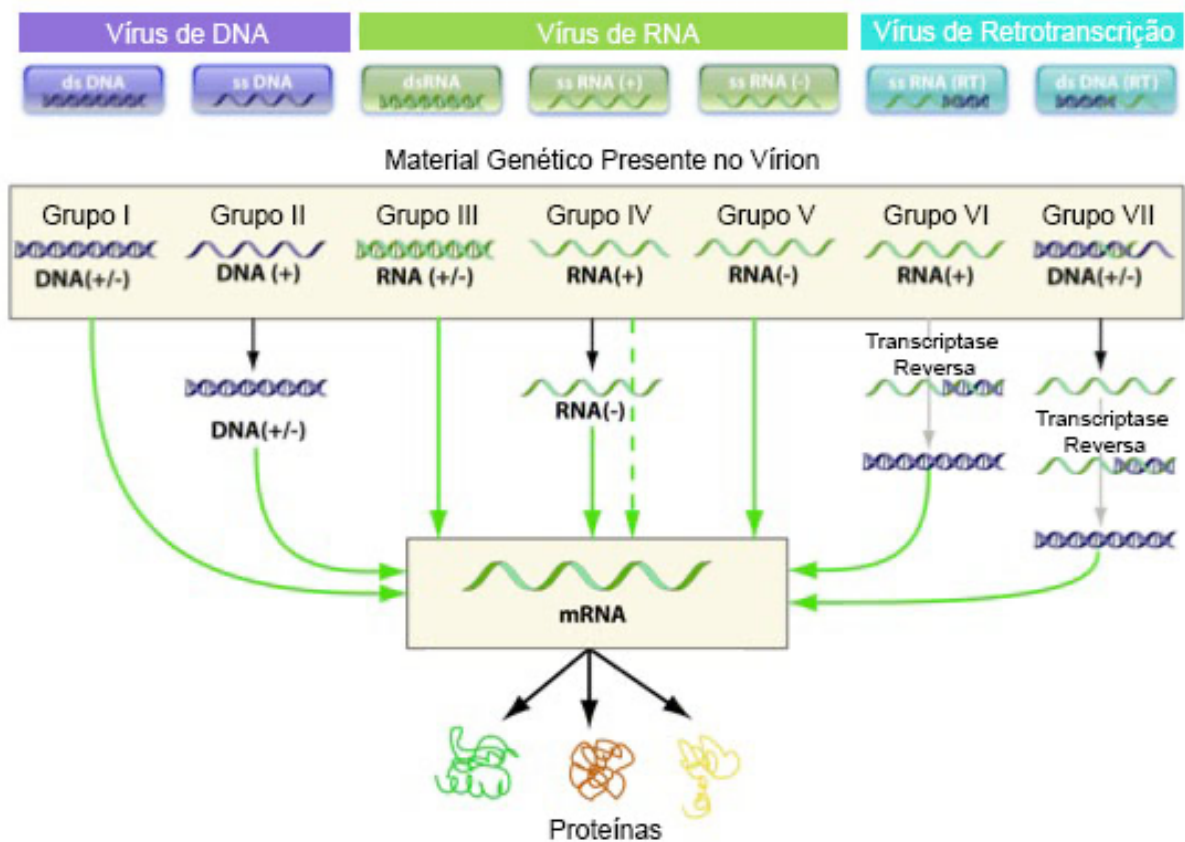


Figura 21. Classificação de Baltimore, dos vírus, de acordo com seu material genómico. (Extraído de: viralzone.expasy.org/all_by_species/254.html)

Seu genoma é capaz de codificar 14 poliproteínas ORF (*Open Reading Frames*). No sentido *forward* (5'→3'), está o gene ORF1ab, que codifica as proteínas não estruturais. E no sentido *reverse* (3'→5'), estão os genes para as proteínas estruturais: E (Envelope), M (Membrana), N (Nucleocapsídeo), S (Spike) e HE (Hemaglutinina-esterase) (Figura 22) (37).

Na Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (rtPCR), são usados *primers* para os genes alvo ORF1ab e o gene N.

Como controlo positivo, é utilizado um DNA complementar (cDNA), fornecido pela BIO-RAD Portugal, atua confirmando que os reagentes liofilizados pelo fornecedor em cada poço, e reconstituído no laboratório, se mantém viáveis e sensíveis a deteção do gene alvo.

Como controlo negativo é usado água destilada, serve para confirmar que não houve contaminação durante a extração e o preparo da reação.

Como controlo interno, a empresa fornecedora utiliza um gene endógeno, que serve para confirmar a viabilidade e a sensibilidade dos reagentes previamente liofilizados pelo fornecedor e reconstituídos no laboratório, e descarta a possibilidade de contaminação.

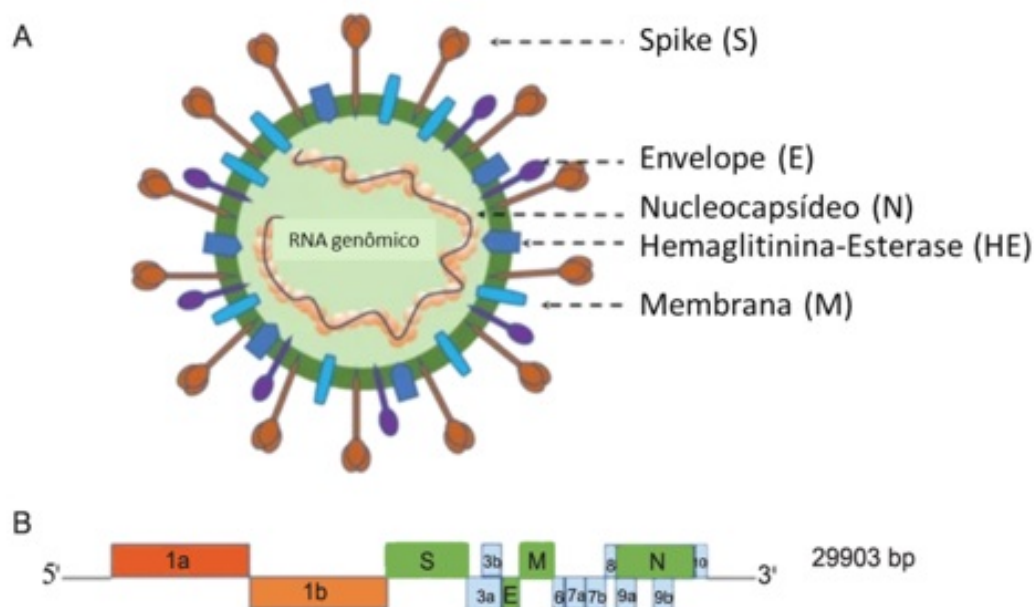


Figura 22. Representação esquemática da partícula viral e do genoma do b-Coronavírus. A: partícula viral; B: genoma viral.

(Extraído de: <https://www.rbac.org.br/artigos/diagnostico-laboratorial-do-sars-cov-2-por-transcricao-reversa-seguida-de-reacao-em-cadeia-da-polimerase-em-tempo-real-rt-pcr/>)

As amostras são colhidas com auxílio de uma zaragatoa, sendo a amostra nasofaríngea a ideal. Após a colheita, a zaragatoa é mantida num tubo *falcon* de 15mL, com 2mL de solução

tampão, para evitar a degradação do material genómico. Dentro da câmara de fluxo laminar, os tubos são vortexados para homogeneizar a amostra, e em seguida se dá a inativação do vírus e a extração e a purificação do RNA viral. Após essa etapa, a amostra é utilizada para realizar a rtPCR, no termociclador (Figura 23), acoplado a um sistema informático, onde o resultado é exposto.



Figura 23. Termociclador, comprado à BIO-RAD Portugal.

Após o término da reação da PCR em tempo real, que leva em torno de uma hora e meia, o *software* Bio-Rad CFX Maestro, gera um gráfico, já com padrões (*Cut-off*) delimitados para os resultados positivos acima de 1.000RFU (Unidade Relativa de Fluorescência) e negativos abaixo de 1.000 RFU, e apresenta as curvas de amplificação do controlo interno e dos genes alvo, com *cut-off* no ciclo 40. A interpretação do resultado está atrelada a associação entre a amplificação dos genes e do ciclo em que ocorreu. Se houver amplificação tardia de apenas um dos genes, ou qualquer outro dado inconclusivo, a diretora técnica é quem dá a palavra final sobre o que deve ser feito, como por exemplo uma nova extração de RNA ou uma nova colheita.

Caso clínico 6

Utente do sexo masculino, com 23 anos de idade, realizou o autoteste em casa, e necessitava do resultado de um teste de PCR para validar o resultado do teste de antigénio e constar no Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE), e ficar em isolamento profilático, com o devido apoio ao trabalhador. Dirigiu-se ao laboratório e foi feita a colheita. Relatou o teste rápido positivo, e sintomas como cefaleias (dor de cabeça) e mialgia

(dor muscular). O resultado, Figura 24, revelou-se positivo, com amplificação dos dois genes N e ORF, confirmando o autoteste realizado em casa.

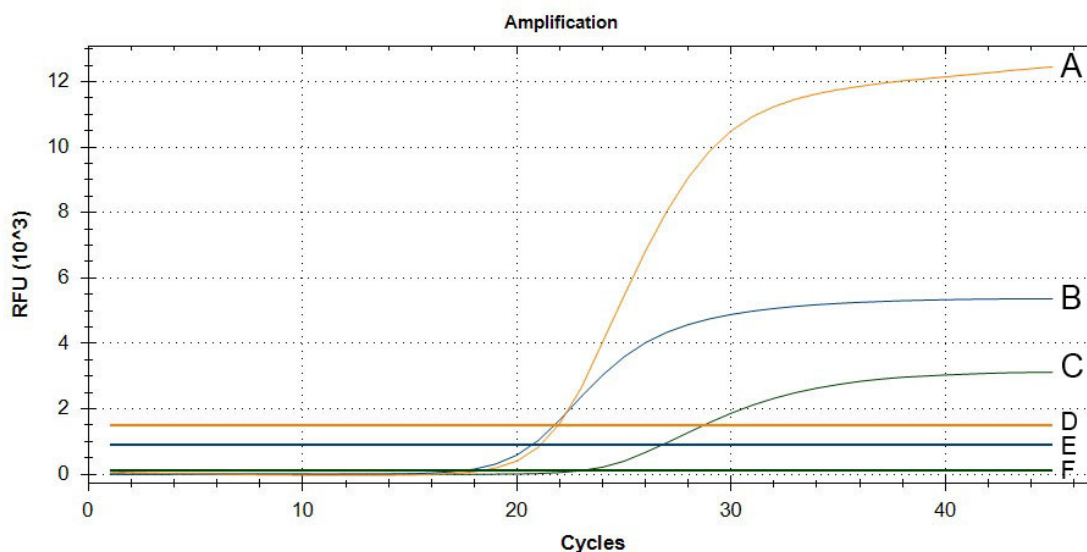


Figura 24. Gráfico gerado pelo software Bio-Rad CFX Maestro. A - Gene N; B - Gene ORF; C - Controlo interno; D - Cut-off Gene N; E - Cut-off Gene ORF; F - Cut-off Controlo interno.

Caso clínico 7

Utente do sexo feminino, ia viajar para um país que exigia teste PCR negativo, e foi ao laboratório. Relatou ter testado positivo para COVID-19 há mais de 3 meses, e não apresentava nenhum sintoma. Também relatou já ter levado 2 doses da vacina. O resultado, Figura 25, revelou uma amplificação tardia do gene N, e o Gene ORF apresentou uma ligeira amplificação tardia, mas abaixo do *cut-off*, pois o protocolo utilizado preconiza um ponto de corte no ciclo 40, e teve como interpretação da direção técnica, um resultado negativo, baseado nos critérios da empresa fornecedora dos *kits* e *software*.

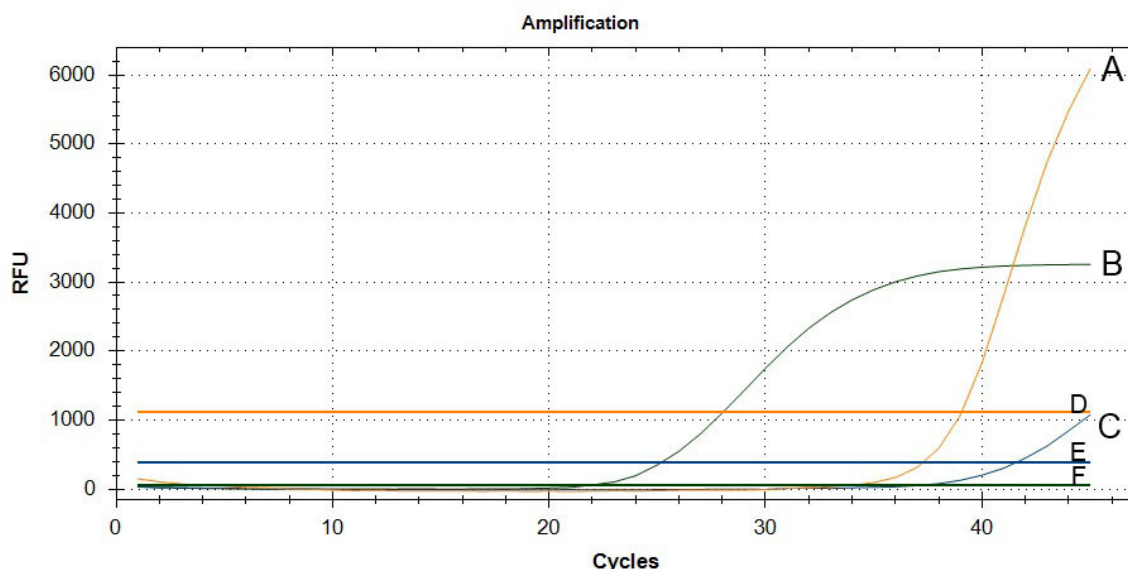


Figura 25. Gráfico gerado pelo software Bio-Rad CFX Maestro. A - Amplificação tardia do Gene N; B - Amplificação esperada do Controle interno; C - Ligeira amplificação tardia do Gene ORF; D - Cut-off Gene N; E - Cut-off Gene ORF; F - Cut-off Controle interno.

6) Hematologia

No setor da hematologia são realizadas determinações como o hemograma com fórmula leucocitária, a determinação da velocidade de sedimentação, e a realização de esfregaço de sangue periférico para contagem diferencial e para contagem de reticulócitos.

O hemograma é dos exames mais solicitados pelos médicos, pois através dele é possível realizar o estudo das células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos). Tal análise é feita a partir da colheita de sangue venoso, para um tubo com anticoagulante (EDTA-K3), um quelante de cálcio, bloqueando a cascata da coagulação e a formação de coágulos, preservando a morfologia das células (38).

6.1) Hemograma

O equipamento Pentra XL80, é utilizado para medir a variação da impedância gerada pela passagem das células, através de uma micro abertura calibrada. Uma alíquota da amostra de sangue total é aspirada, em seguida é diluída num reagente eletrolítico (condutor de corrente) e passa pela micro abertura calibrada de 50µm, no minicitômetro de fluxo. Dois elétrodos, dispostos de cada lado da abertura, através dos quais a corrente elétrica passa continuamente. Quando uma célula passa pela abertura, a resistência elétrica entre os dois elétrodos aumenta proporcionalmente ao volume da célula, identificando o seu tamanho, o tamanho do núcleo e a presença ou ausência de grânulos (39).

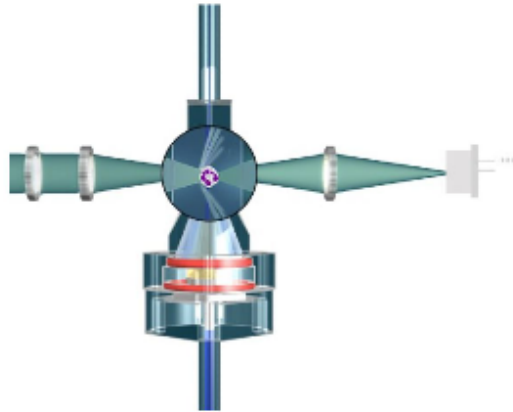


Figura 26. Horiba Pentra XL80, aparelho utilizado para realizar os hemogramas (série vermelha, série branca e plaquetas). Imagem ilustrativa da técnica, extraída do manual do equipamento (39).

6.2) Esfregaço de sangue periférico

Complementarmente ao hemograma completo, realizado de forma automática pelo aparelho, em alguns casos, como em suspeitas de alterações, é importante avaliar o esfregaço (Figura 27), para observar as linhagens eritrocítica (e pesquisar alterações morfológicas, como tamanho, forma, cor e inclusões; e também alterações do estado de maturação), leucocítica (para pesquisa de alterações morfológicas e do estado de maturação), plaquetária (para pesquisa de alterações morfológicas e numéricas), pois algumas doenças estão associadas a uma contagem celular normal mas a uma morfologia celular anormal (40).

A coloração para o estudo morfológico do esfregaço periférico é feita pelo método de *May-Grünwald Giemsa*, essa técnica cora os citoplasmas, núcleos, nucléolos, vacúolos e grânulos das células.

A prática contínua leva à melhoria na produção do esfregaço ou distensão sanguínea, pois como é possível observar na Figura 28, há imensas interferências e/ou falhas que podem levar a uma lâmina imperfeita, o que pode dificultar a correta visualização e identificação das populações celulares (Figura 29).

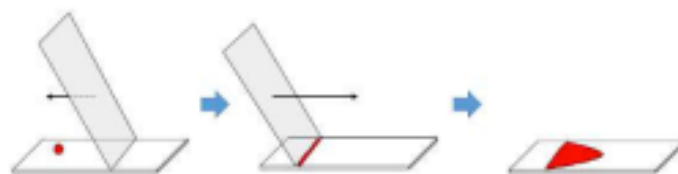


Figura 27. Realização de um esfregaço sanguíneo.

(Extraído de: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/105388/2/200401.pdf>)

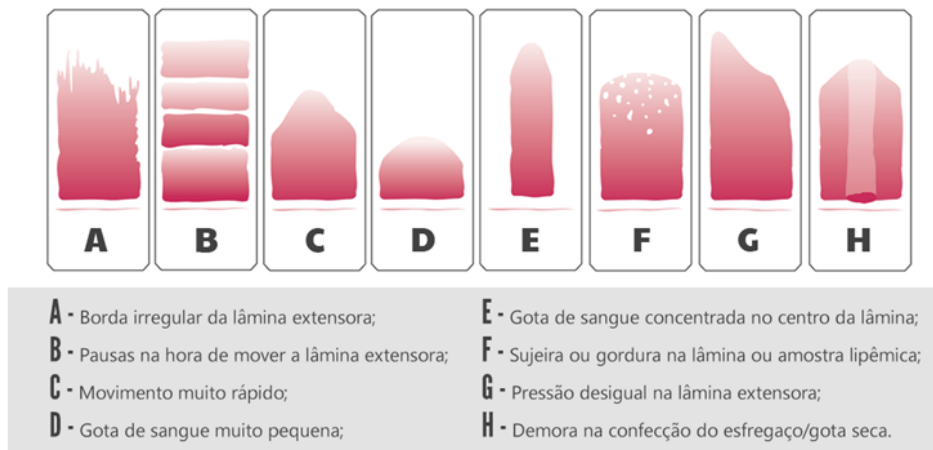


Figura 28. Erros mais comuns na confecção do esfregaço sanguíneo.
 (Extraído de: <https://www.biomedicinapadrazo.com.br/2017/06/erros-mais-comuns-na-confeccao-do.html>)

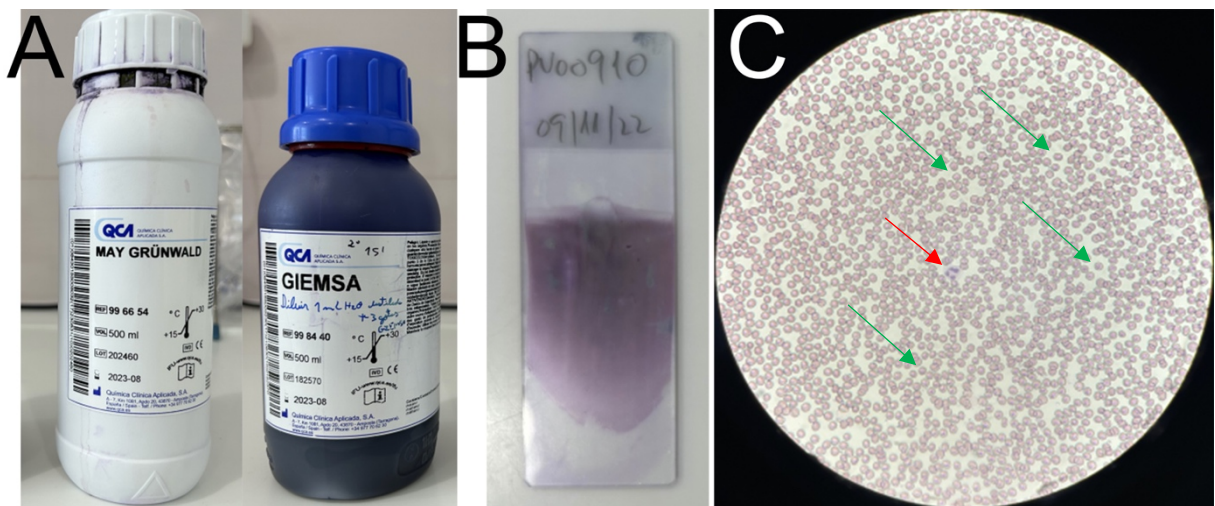


Figura 29. A - Corantes May-Grünwald Giemsa; B - Lâmina sangue produzida por mim; C - Visualização ao microscópio óptico, ampliação de 400x, onde é possível observar numerosos eritrócitos (seta verde) e um neutrófilo hipersegmentado (seta vermelha).

6.3) Contagem de reticulócitos

Os reticulócitos são células imaturas, com presença de restos de Ácido Ribonucleico (RNA) no citoplasma, e a sua presença no sangue periférico é indicativo da atividade eritropoética medular (41). A sua observação pode ser feita através da realização de um esfregaço sanguíneo, realizado após corar uma alíquota do sangue total com azul de cresil brilhante, numa proporção de 1:1 e incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente. Os eritrócitos ficam corados em tom de azul cinzento e as moléculas de RNA ribossômico dos reticulócitos ficam corados em tom azul caneta (Figura 30).

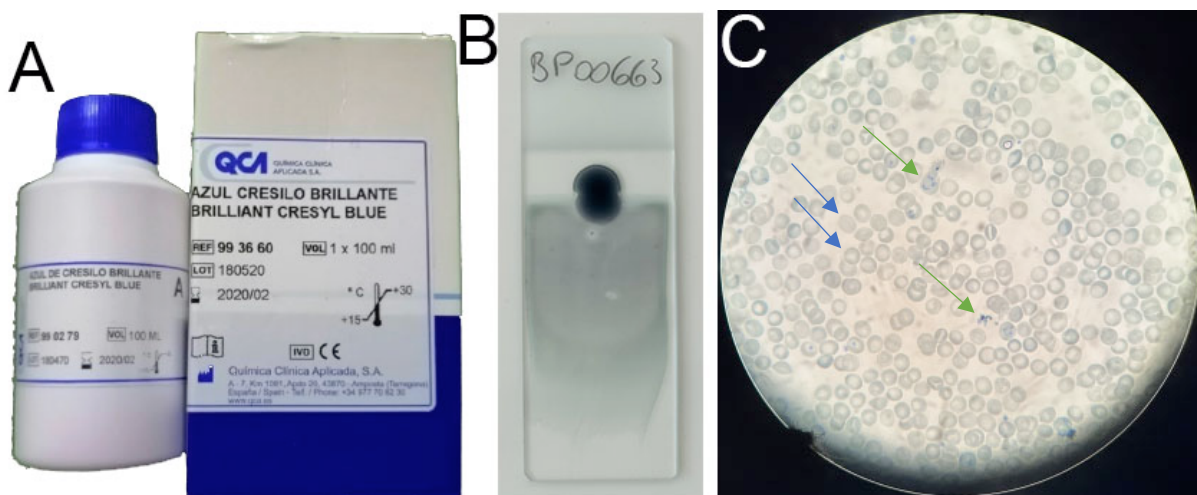


Figura 30. A - Corante Azul Brilhante de Cresil; B - Lâmina de sangue total (EDTA) corada com azul brilhante de cresil; C - Visualização ao microscópio óptico, ampliação de 1000x, com óleo de imersão, eritrócitos (seta azul) e reticulócitos (seta verde).

6.4) Velocidade de Sedimentação (Automatizado)

A velocidade de sedimentação (VS) mede a velocidade com que os eritrócitos sedimentam num tubo, num determinado intervalo de tempo. Apesar de não ser um teste específico, é rápido, direto e de baixo custo. Auxilia na deteção e monitorização de processos inflamatórios, por poder ser um indicador da presença de proteínas de fase aguda, em particular o fibrinogénio, mas também outras como a proteína C reativa (PCR) (42). Estas proteínas induzem alterações na superfície da membrana dos eritrócitos levando à agregação dos mesmos.

O analisador utilizado no laboratório é o Ves-Matic 30, aparelho programado para determinar a velocidade de sedimentação até um máximo de 30 amostras de sangue. O exame é executado em completa automação (agitação e leitura) e os resultados são comparáveis com os obtidos pelo método de *Westergren* modificado, mas com uma duração de 33 minutos (43).



Figura 31. Ves-Matic 30, aparelho utilizado para velocidade de sedimentação.

6.4.1) Velocidade de sedimentação (Manual)

O método de Westergren (Figura 32) é o método manual utilizado na velocidade de sedimentação. Num tubo de sangue total com EDTA-K3, introduz-se um tubo de Westergren. Puxando um êmbolo irá criar vácuo, fazendo com que o sangue fique posicionado verticalmente ao longo do tubo. Após uma hora, efetua-se a leitura em milímetros entre o menisco do plasma e o nível da coluna dos eritrócitos sedimentados (43). Este método manual é realizado no laboratório quando as amostras apresentam insuficiência de sangue para a realização do teste automático.

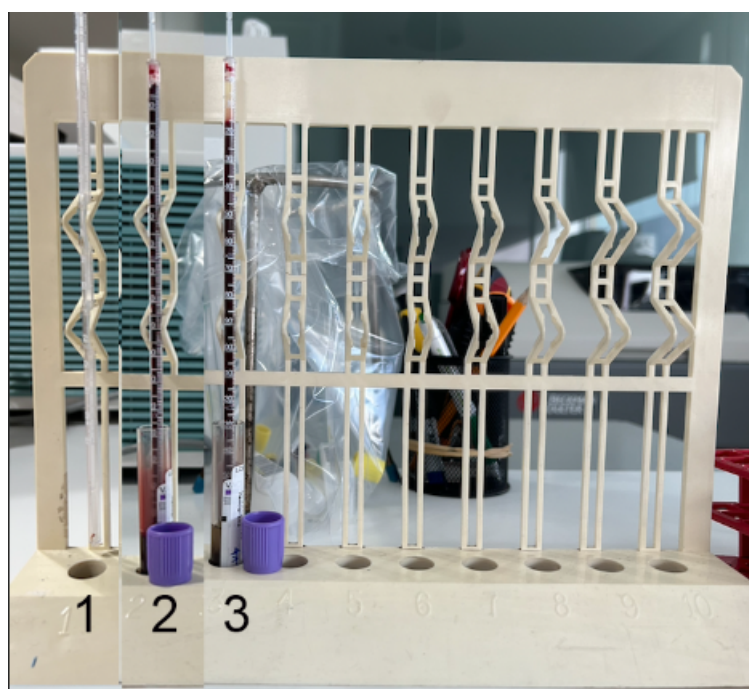


Figura 32. 1 - Tubo de Westergren; 2 - Tubo de Westergren recém preenchido com sangue total com EDTA; 3 - Tubo de Westergren ao fim de 1 hora, revelando como resultado 15mm/hora.

7) Bioquímica Clínica

Nas análises bioquímicas efetuam-se determinações de vários parâmetros, como iões, enzimas e metabolitos. A amostra predominantemente usada é o soro, mas há protocolos que permitem o uso de plasma, líquido cefalorraquidiano, líquido ascítico e líquido pleural, assim como a análise de uma amostra de urina.

As determinações mais comumente realizadas neste setor são a glicose, o ácido úrico, o colesterol total, o colesterol LDL, o colesterol HDL, os triglicerídeos, a ureia, a creatinina, o ionograma, e também enzimas, como a fosfatase alcalina, a gamaglutamiltranspeptidase (gama-GT), a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT). As

determinações desses parâmetros são de suma importância na monitorização das terapêuticas, bem como no diagnóstico de patologias.

As análises desses parâmetros ocorrem de forma automatizada, através do equipamento Beckman Coulter Au-480 (Figura 33), que realiza essas determinações através de técnicas fotométricas.



Figura 33. Aparelho Beckman-Coulter AU480, onde realiza-se a determinação diversos analitos como a Glicose, Ureia, Creatinina, Bilirrubinas, Ácido Úrico, Colesterol Total, HDL e LDL, Triglicéridos, Fosfatase alcalina, AST/TGO, ALT/TGP, GGT, Amilase, Lipase, LDH, CK, Proteínas totais e Albumina, entre outros.

7.1) Hemoglobina Glicada - HbA1C

O teste determina os produtos de glicosilação, utilizado no diagnóstico e no controle de utentes diabéticos tipo II.

Através da reação irreversível entre a glicose sanguínea e o aminoácido valina do terminal amínico da cadeia beta da hemoglobina A, é formada a hemoglobina glicada. A sua determinação se dá através de uma média ponderada, analisando os eritrócitos circulantes cujo tempo de vida médio é de 120 dias. A anemia hemolítica ou estados hemorrágicos podem gerar resultados baixos, por reduzir a sobrevivência das hemácias. Por outro lado, há patologias, como anemias por deficiência de ferro, B12 ou folato, que aumentam o tempo de vida dos eritrócitos, podendo gerar resultados elevados.

O aparelho Adams HA-8160 (Figura 34) faz a determinação da hemoglobina glicada, através da metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de troca iónica.

Com base nas cargas eléctricas, é feita a separação das variantes de hemoglobina. Como a HbA1c tem um menor número de cargas positivas relativamente a HbA, a ligação à coluna de resina com carga negativa, é menos eficiente, por isso é eluída primeiro. É adicionado um segundo tampão para eluir a HbA e a absorvância dos dois eluatos, é utilizada para calcular a percentagem total de HbA1C (44).



Figura 34. Aparelho Adams HA-8160.

Conclusão

Através de todo esforço aplicado na máxima dedicação que eu pude dar ao mestrado, e todo o dia a dia da atividade laboratorial em análises clínicas, e o contacto com o público, acredito que desenvolvi novas capacidades e aprimorei as já adquiridas ao longo do meu percurso.

Durante a elaboração deste relatório e as trocas de informações com os colegas do laboratório mais experientes, pude aprofundar ainda mais os conhecimentos lecionados nas aulas. Pude assim, consolidar ideias e compreender melhor os resultados das análises, não de forma individual, mas correlacionando todo histórico do utente.

Tenho imenso interesse pela área da saúde, aplicando a Biologia Molecular ao diagnóstico, e é isso que pretendo como passo seguinte, continuar me dedicando à compreensão da saúde, e em algum momento, conseguir ingressar no doutoramento.

Bibliografia

- (1) SHCOLNIK, Wilson *et al.* - Resultados de exames laboratoriais não acessados em laboratórios privados brasileiros. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* (2019). [Acedido a 03 de Dezembro de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/tFhM7FbcSDVMMPMvz88pKWb/abstract/?lang=pt>
- (2) INDEVUYST, C. *et al.* - The order of draw: much ado about nothing?. *International Journal of Laboratory Hematology* (2014). [Acedido a 15/12/2022]. Disponível na Internet: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12230>
- (3) CUNHA, Mário e MEIRELES, Glória - Pré analítica: Análises Clínicas e Genética Humana. Congresso de Controlo da Qualidade Laboratorial para Países de Língua Portuguesa, Ordem dos Farmacêuticos de Portugal, 2017. [Acedido a 15/12/2022]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/Eventos/CCQL/MarioCunha_GloriaMeireles_Congresso_Pre_analitica_Analises_Clinicas_e_Genetica_Humana.pdf
- (4) CORNES, Michael *et al.* - The CRESS checklist for reporting stability studies: on behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)* (2020). [Acedido a 15/12/2022]. Disponível na Internet: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2020-0061/html>
- (5) SUN N, KNAUF R - Cross contamination solved by technique. *ASCP Summary Report*, 1977. [Acedido a 15/12/2022]. Disponível na Internet: <https://studylib.net/doc/8728747/nccls-simplifies-the-order-of-draw--a-brief-history>
- (6) CALAM RR, COOPER MH - Recommended 'order of Draw' for collecting blood specimens into additive-containing tubes, 1982. [Acedido a 15/12/2022]. Disponível na Internet: <https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/28/6/1399/5666920?redirectedFrom=fulltext>
- (7) JANEWAY, Charles A, JUNIOR, Paul Travers, Walport, Mark, SHLOMCHIK, Mark J - *Immunobiology*. 5ª Edição, Garland Science, 2001, ISBN:0-8153-3642-X. Capítulo I.
- (8) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Immunity Types (2021). [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/immunity-types.htm>

- (9) MACHADO, Nilton Carlos *et al.* - O perfil da antiestreptolisina O no diagnóstico da febre reumática aguda. *Jornal de Pediatria* (2001). [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.scielo.br/j/jped/a/HYzDKBwDbwMwBZkxGSWCnLG/?lang=pt>
- (10) Nal von Minden; RF Latex Agglutination Test ref 795008 (2021). [Acedido a 18/12/2022]. Disponível na Internet: <https://www.nal-vonminden.com/pt/nadalr-im-latex-test-l-kit-latex-agglutination-test.html>
- (11) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Sexually Transmitted Disease (STDs) (2021). [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/std/syphilis/stdfact-syphilis-detailed.htm>
- (12) POPE, Vicki - Rapid Plasma Reagin 18-MM Circle Card Test - Syphilis Serology Reference Laboratory (2001-2002). [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_01_02/136_b_met_syphilis_rapid_plasma_reagin.pdf
- (13) Caquet R. Guia Prático de Análises Clínicas. 1ª Edição. Climepsi; 2004.
- (14) WILLIAMSON, M.A; SNYDER, L.M. - Wallach: interpretação de exames laboratoriais. 9ª Edição, Guanabara Koogan, 2013, ISBN: 978-85-277-2230-8. páginas 50-51; 139-140; 167; 302-312; 370-440; 840- 898.
- (15) Nal von Minden; hCG pregnancy test REF 142000 (2017). [Acedido a 17/12/2022]. Disponível na Internet: <https://www.nal-vonminden.com/en/nadalr-hcg-pregnancy-test-lx30-test-cassettes-l276.html>
- (16) Miočević, O. *et al.* - Quantitative Lateral Flow Assays for Salivary Biomarker Assessment: A Review. *Frontiers in Public Health* (2017). [Acedido a 03/07/2023]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5469882/>
- (17) BIOTECH - COVID-19 Ag Rapid Teste - [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: <https://drive.google.com/file/d/1f7-7S9aSzv-H9luFXznYnRkQDdJuht8u/view>
- (18) FONSECA, A.B. *et al.* - Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004.
- (19) Shekarchi, I. C., Sever, J. L., Nerurkar, L., & Fuccillo, D. (1985). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with enzyme-linked fluorescence assay with automated readers

for detection of rubella virus antibody and herpes simplex virus. *Journal of clinical microbiology*, 21(1), 92-96.

(20) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Parasites - Toxoplasmosis (Toxoplasma infection) (2018). [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/disease.html>

(21) Protocolo do equipamento VIDAS® - TOXO IgG (2015). [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: <https://fardavar.com/Upload/%D9%85%D8%B4%D8%AE%D8%B5%D8%A7%D8%AA%20%D9%85%D8%AD%D8%B5%D9%88%D9%84/TOXG.pdf>

(22) Protocolo do equipamento VIDAS® - TOXO IgM (2015). [Acedido a 02/02/2023]. Disponível na Internet: <https://fardavar.com/Upload/%D9%85%D8%B4%D8%AE%D8%B5%D8%A7%D8%AA%20%D9%85%D8%AD%D8%B5%D9%88%D9%84/Guide%20TOXO%20IGM.pdf>

(23) GRANATO, C.F.H., and PAULINI JUNIOR, I.J. Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose. In: SOUZA, W., and BELFORT JR., R., comp. Toxoplasmose & Toxoplasma gondii [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, pp. 127-135. ISBN: 978-85-7541-571-9.

(24) DAHER S, GALVÃO C, ABE A, COCCO R. Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 2009; 32:3-8.

(25) LLOID M. PathCare Pathology forum: allergy investigations. 1st edition. PathCare Business Centre, 2014. [Acedido a 18/12/2022]. Disponível na Internet: <https://silو.tips/download/06-section-I-an-introduction-to-diagnostic-investigations-for-allergies-08-section>

(26) CHAVES, Erika Arruda - Pruebas diagnósticas en alergia y su utilidad clínica. *Revista Medica Herediana* (2004). [Acedido a 18/12/2022]. Disponível na Internet: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2004000200010

(27) Sunder, M.; Leslie, S. W. - Semen Analysis - StatPearls (2022). [Acedido a 18/12/2022]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564369/>

(28) FAVALORO, Emmanuel, LIPPI, Giuseppe - Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols. 1st Ed. New York: Humana Press Elsevier, 2017. ISBN: 978-1-4939-7194- 7.

- (29) CHANDLER, W. *et al.* - Handbook of diagnostic hemostasis and thrombosis tests. 3th edition. University of Washington, Department of Laboratory Medicine (2005). [Acedido a 03/07/2023]. Disponível na Internet: <https://dl.icdst.org/pdfs/files/0ee21ab067297739ee9c8255585191e2.pdf>
- (30) MARDE Victor J. *et al.* - Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practice. 6th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwe, 2013. ISBN: 978-1-60831-906-0.
- (31) TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 70.
- (32) Esquema ilustrando os componentes da parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas. [Acedido a 03/07/2023]. Disponível na Internet: <https://jaleko-blog-files.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2019/11/06174353/Esquema-ilustrando-os-componentes-da-parede-celular-de-bacterias-Gram-positivas-e-Gram-negativas.png>
- (33) BENSON, Harold J. - Microbiological Applications - Laboratory Manual in General Microbiology. 8^a Ed. [S.l.], The McGraw-Hill, 2001. ISBN 0-07-231888-0.
- (34) Menezes e Silva, C. H. P - Corpocultura - Protocolos de Microbiologia Clínica (2008). [Acedido a 03/07/2023]. Disponível na Internet: https://www.newslab.com.br/wp-content/uploads/yumpu_files/Especial%20microbiologia%20Pt.%201.pdf
- (35) Power, D. A., & Johnson, J. A. - Difco™ & BBL™ manual - Manual of Microbiological Culture Media, 359-60 (2009). [Acedido a 03/07/2023]. Disponível na Internet: https://www.bd.com/documents/guides/user-guides/DS_CM_Difco-and-BBL-culture-media-manual_UG_EN.pdf
- (36) FARGETTE, D e FAUQUET, CM - International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species - Virology Journal (2005). [Acedido a 04/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1208960/>
- (37) MARTINELLO, Flávia, LIMA, Lenilza Mattos e MENEZES, Maria Elizabeth - Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) - Revista Brasileira de Análises Clínicas (2020). [Acedido a 04/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.rbac.org.br/artigos/diagnostico-laboratorial-do-sars-cov-2-por-transcricao-reversa-seguida-de-reacao-em-cadeia-da-polimerase-em-tempo-real-rt-pcr/>

(38) BAIN, Barbara J. - Células sanguíneas: um guia prático. 5ª Edição, Artmed, 2016, ISBN:978-85-8271-330-3. P: 5-15.

(39) HORIBA - Pentra XL80 - Manual do equipamento. [Acedido a 04/02/2023]. Disponível na Internet: https://ia801900.us.archive.org/2/items/manual_Horiba_ABX_Pentra_XL80_User_Manual/Horiba_ABX_Pentra_XL80_User_Manual.pdf

(40) Henry JB. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 20º Edição. Manole LTDA (2008).

(41) Merlin, J. C. *et al.* - Parâmetros reticulocitários para monitoramento de anemia em pacientes com doença renal crônica em diálise peritoneal. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* (2021). [Acedido a 04/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/DcyW3rsfNF8vgCVhjZDgRBc/?format=pdf&lang=pt>

(42) JAIN, Sachin, GAURAM, Vidhi, and NASEEM, Sania - Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*. (2011). [Acedido a 01/01/2023]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3053509/>

(43) Dos Santos, V.M.; Da Cunha, S.F. de C.; Da Cunha, D.F. - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Revista da Associação Médica Brasileira*. [Acedido a 04/02/2023]. Disponível na Internet: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/dvfCfth8ckyq9dj3QCCTxGg/?format=pdf&lang=pt>

(44) Manual ADAMS A1c. [Acedido a 04/02/2023]. Disponível na Internet: <https://pdf.medicaexpo.com/pt/pdf-en/arkray/ha-8180t/80534-259449.html#open508058>