

Comparação de métodos em pesquisa de sangue oculto em fezes. Relatório de estágio em Análises Clínicas

João Tiago Ramos Crucho

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Dr. Rui Pedro Antunes Alves Teixeira
Co-orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

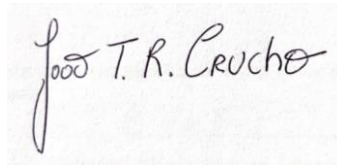
junho de 2024

Declaração de Integridade

Eu, João Tiago Ramos Crucho, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12674 de Bioquímica da Faculdade Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 11 /06 /2024

A handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature reads "João T. R. Crucho" in a cursive script. The first letter 'J' is large and stylized, with a long vertical stroke extending downwards. The rest of the name is written in a more compact, flowing cursive.

(João Tiago Ramos Crucho)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, por todos os esforços feitos e por terem tornado esta conquista possível.

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a todos os que contribuíram para a realização deste estágio e projeto de investigação no Serviço de Patologia Clínica do ULS CHUCB.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr.º Rui pela orientação, apoio e incentivo ao longo deste percurso. A sua experiência, paciência e disponibilidade foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi muito consigo. Obrigado.

Ao meu coorientador, Prof. Dr.º Samuel pelo apoio, compreensão e pela disponibilidade, ao longo do ano letivo.

Ao Serviço de Patologia Clínica do ULS Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, em especial a Dr.ª Patrícia Ibarzabal, por ter autorizado este estágio de forma a proporcionar-me uma experiência enriquecedora.

Quero também agradecer a Dr.ª Paula Gouveia, Dr.ª Ana Esteves, Dr.ª Carmo, Dr.ª Joana Morais, Silvia Martins e a todos os profissionais do laboratório por todos os ensinamentos e camaradagem durante este estágio.

À minha família, especialmente aos meus pais, avós e irmã, gostaria de expressar a minha imensa gratidão pelo amor, compreensão e apoio incondicional ao longo dos anos. Sem o vosso encorajamento e sacrifícios, não teria sido possível alcançar tantos objetivos.

Um agradecimento muito especial à minha companheira e namorada, Madalena Lamarão. A tua paciência, compreensão e apoio constante foram fundamentais para superar os desafios deste percurso. O teu amor e encorajamento diário deram-me forças nos momentos mais difíceis e inspiraram-me a continuar a perseguir os meus objetivos. Esta conquista é tanto minha quanto tua.

Aos meus amigos David Sousa, Miguel Neto, José Pereira e Carolina Gomes que estiveram sempre presentes nos momentos de alegria e de dificuldade, agradeço pela amizade, pelas palavras de incentivo e pelo suporte ao longo destes anos.

A todos, o meu sincero obrigado.

Resumo

Este relatório descreve as atividades e experiências adquiridas durante os oito meses do estágio curricular realizadas no Serviço de Patologia Clínica na Unidade Local de Saúde do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, no âmbito do Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior. O presente relatório retrata a passagem nos principais setores do laboratório de patologia clínica, estes setores incluem a microbiologia, hematologia e imunoquímica. O relatório destaca, principalmente, as metodologias e características de cada um dos setores e os exames mais solicitados na rotina diária de um laboratório de análises clínicas hospitalar. Em paralelo, foi realizado um projeto de investigação que teve como objetivo principal comparar a eficácia de dois kits para a pesquisa de sangue oculto nas fezes, um teste cromatográfico qualitativo e um teste turbidimétrico quantitativo. Foi feita uma análise comparativa onde foram utilizadas amostras de fezes provenientes da rotina do laboratório. As amostras foram testadas com ambos os kits, destacando-se o número de resultados positivos para um valor de *cut-off* de 50 ng/mL no teste turbidimétrico. Este teste demonstrou maior sensibilidade, pois resultou num maior número de amostras positivas, em comparação com o teste cromatográfico qualitativo. Contudo, a impossibilidade de confirmar os diagnósticos clínicos limitaram a capacidade de realizar uma análise estatística completa e de validar a superioridade clínica do teste FOB Turbilatex® Combo (CerTest) quantitativo. Os resultados mostraram que o teste quantitativo pode ser mais eficaz na deteção de sangue oculto nas fezes do que o teste qualitativo já utilizado no laboratório de microbiologia do serviço de patologia clínica, o NADAL® FOB cromatográfico (*cut-off* 40 ng/mL). Isto indica que tem um maior potencial para a deteção precoce de condições gastrointestinais, como o cancro colorretal (CCR). Apesar das limitações encontradas ao longo deste projeto, estes resultados estão de acordo com a literatura existente, que indica para a melhor sensibilidade e especificidade dos métodos quantitativos. Futuras pesquisas devem incluir diagnósticos clínicos confirmados para se poder avaliar a eficácia dos testes, e é também essencial uma maior quantidade de amostras na região local da Covilhã e Fundão. Estudos adicionais devem avaliar a taxa de falsos positivos e negativos, e uma análise de custo-benefício é necessária para determinar a viabilidade económica da implementação do novo teste. Avaliar o impacto do teste quantitativo num programa de rastreio populacional ajudará a determinar a eficácia na deteção

precoce do CCR e outras condições gastrointestinais, influenciando a taxa de mortalidade.

Palavras-chave

Microbiologia;FOBT;iFOBT;cromatográfico;turbidimétrico;quantitativo;*cut-off*;
Architect c8000;imunoquímico;Relatório de Estágio;Análises Clínicas;

Abstract

This report describes the activities and experiences acquired during the eight-month curricular internship carried out at the Clinical Pathology Service of the Local Health Unit of the Cova da Beira University Hospital Center, as part of the Master's Degree in Biochemistry at the Faculty of Sciences of the University of Beira Interior. This report depicts the rotation through the main sectors of the clinical pathology laboratory, which include microbiology, hematology, and immunochemistry. The report primarily highlights the methodologies and characteristics of each sector and the most requested tests in the daily routine of a hospital clinical analysis laboratory. In parallel, a research project was conducted with the main objective of comparing the efficacy of two kits for detecting occult blood in feces, a qualitative chromatographic test, and a quantitative turbidimetric test. A comparative analysis was performed using stool samples from the laboratory routine. The samples were tested with both kits, with the number of positive results for a cut-off value of 50 ng/mL in the turbidimetric test standing out. This test demonstrated greater sensitivity as it resulted in a higher number of positive samples compared to the qualitative chromatographic test. However, the inability to confirm clinical diagnoses limited the capacity to perform a complete statistical analysis and validate the clinical superiority of the quantitative FOB Turbilatex® Combo (CerTest) test. The results showed that the quantitative test might be more effective in detecting occult blood in feces than the qualitative test already used in the microbiology laboratory of the clinical pathology service, the NADAL® FOB chromatographic (cut-off 40 ng/mL). This indicates a greater potential for the early detection of gastrointestinal conditions, such as colorectal cancer (CRC). Despite the limitations encountered throughout this project, these results are in line with existing literature, which indicates better sensitivity and specificity of quantitative methods. Future research should include confirmed clinical diagnoses to assess the efficacy of the tests, and a larger sample size from the local regions of Covilhã and Fundão is also essential. Additional studies should evaluate the rate of false positives and negatives, and a cost-benefit analysis is necessary to determine the economic feasibility of implementing the new test. Assessing the impact of the quantitative test in a population screening program will help determine its effectiveness in the early detection of CRC and other gastrointestinal conditions, influencing mortality rates.

Keywords

Microbiology;FOBT;iFOBT;Chromatographic;Turbidimetric;Quantitative;*Cut-off*;Architect c8000;Immunochemical;Internship report;Clinical analysis;

Índice

| | |
|--|----|
| Capítulo 1: Relatório de Estágio..... | 1 |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica..... | 1 |
| 3. Laboratório de Microbiologia..... | 2 |
| 3.1. Análise Microscópica..... | 2 |
| 3.1.1. Coloração de Gram..... | 3 |
| 3.1.2. Coloração de Ziehl-Neelsen..... | 4 |
| 3.2. Técnicas de sementeira em meios sólidos..... | 5 |
| 3.3. Meios de Cultura..... | 6 |
| 3.3.1. Tipos de Meios de Cultura..... | 6 |
| 3.3.1.1. Meios não seletivos enriquecidos..... | 7 |
| 3.3.1.2. Meios seletivos e meios diferenciais..... | 8 |
| 3.3.1.3. Meios especializados..... | 12 |
| 3.4. Incubação, estufas e respetivas atmosferas..... | 12 |
| 3.5. Testes auxiliares à identificação de microrganismos e testes de sensibilidade aos antibióticos..... | 13 |
| 3.5.1. Identificação baseada em características metabólicas..... | 13 |
| 3.5.2. Testes automáticos..... | 16 |
| 3.6. Produtos Biológicos..... | 20 |
| 3.6.1. Urinas..... | 20 |
| 3.6.2. Fezes..... | 21 |
| 3.6.3. Hemoculturas..... | 23 |
| 3.6.4. Aparelho Respiratório..... | 24 |
| 3.6.5. Expetorações e Secreções Brônquicas..... | 24 |
| 3.6.5.1. Lavado Bronco-alveolar e Aspirado Brônquico..... | 24 |
| 3.6.5.2. Catéter..... | 25 |
| 3.6.6. Aparelhos Genitais..... | 25 |
| 3.6.6.1. Exsudado Vaginal e Uretral..... | 25 |
| 3.6.7. Exsudado Nasal..... | 25 |
| 3.6.7.1. Exsudado orofaríngeo..... | 26 |
| 3.6.8. Produtos em Zaragatoa..... | 26 |
| 3.6.8.1. Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 26 |
| 3.6.8.2. Pesquisa de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 26 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.6.9. | Líquidos Estéreis Biológicos..... | 26 |
| 3.6.9.1. | Líquido Pericárdico..... | 26 |
| 3.6.9.2. | Líquido Ascítico (Peritoneal)..... | 27 |
| 3.6.9.3. | Líquido Articular/Sinovial..... | 27 |
| 3.6.9.4. | Líquido Cefalorraquidiano..... | 27 |
| 3.6.10. | Pús..... | 27 |
| 3.6.11. | Biópsia..... | 28 |
| 3.7. | Testes de Biologia Molecular..... | 28 |
| 3.7.1. | Teste Xpert® MTB/RIF..... | 28 |
| 3.7.2. | Teste Xpert® Carba-R..... | 29 |
| 3.7.3. | Teste Xpert® MRSA NxG..... | 29 |
| 3.7.4. | Teste Xpert® CT/NG..... | 29 |
| 3.8. | Visualização da Bancada..... | 29 |
| 3.9. | Controlo de qualidade do laboratório de microbiologia..... | 30 |
| 4. | Laboratório de Hematologia..... | 32 |
| 4.1. | Análise Microscópica..... | 32 |
| 4.1.1. | Técnicas de coloração automatizadas..... | 32 |
| 4.1.2. | Coloração por May-Grunwald/Giemsa..... | 33 |
| 4.1.3. | Coloração de Perls..... | 33 |
| 4.1.4. | Teste de Falciformação..... | 33 |
| 4.2. | Hematopoiese..... | 33 |
| 4.3. | Hemograma..... | 34 |
| 4.3.1. | Eritrograma..... | 35 |
| 4.3.2. | Eritrócitos..... | 35 |
| 4.3.3. | Hemoglobina..... | 35 |
| 4.3.4. | Hematócrito..... | 36 |
| 4.3.5. | Índices Hematimétricos..... | 36 |
| 4.3.6. | Reticulócitos..... | 37 |
| 4.4. | Leucograma..... | 37 |
| 4.4.1. | Leucócitos..... | 37 |
| 4.4.2. | Neutrófilos..... | 38 |
| 4.4.3. | Eosinófilos..... | 38 |
| 4.4.4. | Basófilos..... | 38 |
| 4.4.5. | Linfócitos..... | 38 |
| 4.4.6. | Monócitos..... | 39 |
| 4.5. | Plaquetograma..... | 39 |
| 4.5.1. | Plaquetas..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 4.6. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária..... | 40 |
| 4.7. Análise de Hemoglobina Glicada, A2 e Fetal..... | 40 |
| 4.8. Hemostase..... | 41 |
| 4.9. Coagulação..... | 42 |
| 4.9.1. Estudo da Hemóstase..... | 44 |
| 4.10. Testes de Biologia Molecular..... | 48 |
| 4.9.2. Teste Xpert® HemosIL FII & FV..... | 48 |
| 4.9.3. Teste Xpert® BCR-ABL Ultra..... | 48 |
| 4.11. Citometria de Fluxo..... | 49 |
| 5. Laboratório de Imunoquímica..... | 51 |
| 5.1. Procedimentos Analíticos..... | 51 |
| 5.1.1. Fase Pré-Analítica..... | 51 |
| 5.1.2. Fase Analítica..... | 52 |
| 5.1.3. Fase Pós-Analítica..... | 53 |
| 5.2. Química Analítica..... | 53 |
| 5.2.1. Cobas® Serie 8000..... | 53 |
| 5.2.1.1. Cobas® Série 8000: Módulo ISE..... | 54 |
| 5.2.1.2. Cobas® Série 8000: Módulo c502..... | 54 |
| 5.2.1.3. Cobas® Série 8000: Módulo e602..... | 54 |
| 5.2.2. Cobas® e411..... | 56 |
| 5.2.3. Abbott Architect i2000SR..... | 57 |
| 5.2.4. Atellica® NEPH 630 System..... | 58 |
| 5.3. Testes Imunológicos..... | 58 |
| 5.3.1. ImmunoCAP™ 250..... | 58 |
| 5.3.2. Eletroforese de Proteínas Séricas..... | 60 |
| 5.3.2.1. CAPILLARYS 3 Octa (Sebia) | 60 |
| 5.3.2.2. HYDRASIS Focusing (Sebia)..... | 61 |
| 5.4. Testes Rápidos..... | 62 |
| 5.4.1. Pesquisa de Drogas de Abuso..... | 62 |
| 5.4.2. Teste de Gravidez..... | 63 |
| 6. Conclusão..... | 64 |
| Capítulo 2: Projeto de Investigação..... | 66 |
| 1. Introdução..... | 66 |
| 1.1. Cancro Colorretal..... | 67 |
| 1.1.1. Pólipos..... | 67 |
| 1.1.2. Progressão dos Pólipos para o cancro..... | 68 |

| | |
|--|--------|
| 1.2.Fatores de Risco para Cancro Colorretal..... | 69 |
| 1.3.Opções de rastreio para Cancro Colorretal..... | 70 |
| 1.4.Colonoscopia..... | 71 |
| 1.5.Testes de sangue oculto nas fezes (FOBT) e testes imunoquímicos fecais (iFOBT)..... | 72 |
| 1.6.Escolha de um teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) ara o contexto de rastreio..... | 74 |
| 1.7.Causas de positividade..... | 77 |
| 1.8.Possíveis Desvantagens..... | 78 |
| 1.9.Métodos imunoquímicos, ligação antigénio-anticorpo..... | 78 |
| 1.10.FOB Turbilatex® Combo (CerTest)..... | 79 |
| 1.11.NADAL® FOB (Nal Von Minden)..... | 79 |
| 2. Objetivos do Projeto de Investigação..... | 80 |
| 3. Material e métodos..... | 81 |
| 3.1.Recolha de dados..... | 81 |
| 3.2.Processamento das amostras..... | 81 |
| 3.3.Análise estatística..... | 83 |
| 4. Resultados..... | 84 |
| 5. Discussão de resultados..... | 89 |
| 6. Conclusão e Perspetivas Futuras..... | 92 |
| Bibliografia..... | 94 |
| Anexos..... | 102 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1- Procedimento da coloração de Gram..... | 3 |
| Figura 2- Imagem microscópica, coloração de Gram efetuada no laboratório de microbiologia..... | 4 |
| Figura 3- Figura adaptada do livro “ <i>Medical Microbiology</i> ” ⁽⁴⁾ disponível no laboratório de microbiologia..... | 4 |
| Figura 4- Ilustração da sementeira por quadrantes..... | 5 |
| Figura 5- Ilustração da sementeira para quantificação..... | 6 |
| Figura 6- ETEST® (BioMérieux) em tira..... | 16 |
| Figura 7- VITEK®2 COMPACT (BioMérieux)..... | 17 |
| Figura 8- Ilustração do procedimento do Qvella Fast System ⁽²⁰⁾ | 19 |
| Figura 9- MALDI-TOF MS no laboratório de microbiologia do SPC..... | 20 |
| Figura 10- Teste positivo para <i>Helicobacter pylori</i> | 22 |
| Figura 11- Yumizen H2500 (Horiba Medical®)..... | 34 |
| Figura 12- Sediplus® S2000 (SARSTEDT)..... | 40 |
| Figura 13- ADAMS™ A1c HÁ-8180T (ARKRAY)..... | 41 |
| Figura 14- O envolvimento dos vasos sanguíneos, das plaquetas e da coagulação sanguínea na hemóstase. Figura adaptada do livro “Fundamentos em hematologia de Hoffbrand” ⁽⁵⁰⁾ | 42 |
| Figura 15- As vias intrínsecas, extrínsecas e comuns da coagulação. Figura adaptada do livro “Fundamentos em hematologia de Hoffbrand” ⁽⁵⁰⁾ | 44 |
| Figura 16- ACL TOP 750 (Instrumentation Laboratory, Werfen)..... | 45 |
| Figura 17- Cobas® p612 laboratório de imunoquímica..... | 52 |
| Figura 18- Cobas® Serie 8000 laboratório de imunoquímica. (Unidade Core/Módulo ISE/Módulo c502/dois Módulos e602)..... | 54 |
| Figura 19- Cobas® e411 laboratório de imunoquímica..... | 56 |
| Figura 20- Abbott Architect i2000SR laboratório de imunoquímica..... | 57 |
| Figura 21- ImmunoCAP™ 250 laboratório de imunoquímica..... | 59 |
| Figura 22- CAPILLARYS 3 Octa (Sebia) laboratório de imunoquímica..... | 60 |
| Figura 23- Proteinograma de um doente com um mieloma múltiplo..... (Albumina 29,4%, Alfa-globulina (alfa-1 a 4,3% e alfa-2 a 10,2%), Beta-globulina (beta-1 a 3,9%< e beta-2 a 3,2%) e Gama-globulina a 49%>)...... | 61 |
| Figura 24- HYDRASIS Focusing (Sebia) laboratório de imunoquímica..... | 62 |

| | |
|---|----|
| Figura 25- Gel de Perfil Urinário..... | 62 |
| Figura 26- Gel de Imunofixação Sérica..... | 62 |
| Figura 27- Gráfico estatístico “ <i>Cancer today</i> ”. Disponível em Global Cancer Observatory..... | 67 |
| Figura 28- Etapas fundamentais no processo de rastreio do CCR..... | 71 |
| Figura 29- Sensibilidade e especificidade relatadas para CCR em uma faixa de testes iFOBT. Figura adaptada do artigo ⁽¹⁰³⁾ | 75 |
| Figura 30- Processamento da amostra. Figura adaptada da bula do kit FOB Turbilatex® Combo (CerTest). ⁽¹⁰³⁾ | 82 |
| Figura 31- Resumo dos testes imunológicos da pesquisa de sangue oculto nas fezes (iFOBT)..... | 83 |
| Figura 32- Gráfico 1: concentração média da hemoglobina em ng/mL das 3 amostras..... | 87 |
| Figura 33- Gráfico 2: concentração média de hemoglobina / idade dos doentes estudados..... | 88 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do ULS CHUCB..... | 7 |
| Tabela 2- Alguns exemplos de meios seletivos e diferenciais..... | 8 |
| Tabela 3- Castas de ID para o VITEK® COMPACT..... | 17 |
| Tabela 4- Cartas de AST para o VITEK® COMPACT..... | 17 |
| Tabela 5- Densidade ótica para a padronização do inóculo..... | 18 |
| Tabela 6- Testes rápidos parasitológicos..... | 22 |
| Tabela 7- Testes rápidos para bactérias..... | 22 |
| Tabela 8- Testes rápidos para vírus..... | 23 |
| Tabela 9- Medições coagulométricas..... | 44 |
| Tabela 10- Estudos dos distúrbios hemorrágicos..... | 46 |
| Tabela 11- Estudos dos distúrbios trombóticos..... | 47 |
| Tabela 12- O que são calibradores e controles..... | 52 |
| Tabela 13- Parâmetros analisados no módulo c502..... | 55 |
| Tabela 14- Parâmetros analisados no módulo e602..... | 56 |
| Tabela 15- Parâmetros analisados no Cobas® e411..... | 56 |
| Tabela 16- Parâmetros analisados no Abbott Architect i2000SR..... | 57 |
| Tabela 17- Parâmetros analisados no Atellica® NEPH 630 System..... | 58 |
| Tabela 18- Benefícios da utilização de iFOBTs..... | 76 |
| Tabela 19- Principais características dos diferentes testes de rastreio CCR..... | 76 |
| Tabela 20- Resultados da concentração de hemoglobina presente nas amostras (1,2 e 3) de fezes para cada um dos 40 doentes estudados..... | 85 |
| Tabela 21- Comparação dos resultados dos dois kits diferentes..... | 86 |

Lista de Acrónimos

| | |
|----------|--|
| ADP | Adenosina Difosfato |
| AL | Anticoagulante Lúpico |
| AT | Antitrombina |
| ATPP | Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| B.A.A.R. | Bacilo Álcool-Ácido Resistente |
| BCG | Bacilo Calmette-Guérin |
| CCR | Cancro Colorretal |
| CF | Citometria de Fluxo |
| CHCM | Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média |
| CHUCB | Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira |
| CIM | Concentração Mínima Inibitória |
| CIVD | Coagulação Intravascular Disseminada |
| CQE | Controlo de Qualidade Externo |
| CQI | Controlo de Qualidade Interno |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DST | Doença Sexualmente Transmissível |
| DvW | Doença de von Willebrand |
| EC | Eletroforese Capilar |
| EIA | Ensaio Imunoenzimático |
| ELISA | Ensaio de Imunoabsorção Enzimática |
| FOBT | Teste de Sangue Oculto nas Fezes |
| GFOBT | Teste de Sangue Oculto nas Fezes com guáiac |
| GLU | Ácido Glutâmico |
| GN | Gram Negativo |
| GP | Gram Positivo |
| Hb | Hemoglobina |
| HCG | Gonadotrofina Coriônica Humana |
| HCM | Hemoglobina Corpuscular Média |
| Hct | Hematócrito |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Afinidade |
| HWHK | Cinínogénio de Alto Peso Molecular |
| ID | Identificação |
| IGRA | Do inglês “ <i>Interferon Gama Release Assay</i> ” |
| IFOBT | Teste Imunoquímico de Sangue Oculto nas Fezes |
| IgE | Imunoglobulina E |
| INSA | Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge |
| LCR | Líquido Cefalorraquidiano |
| LDH | Lactato Desidrogenase |
| LMC | Leucemia Mieloide Crónica |
| mRNA | Ácido Ribonucleico Mensageiro |
| MPV | Volume Plaquetar Médio |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina |
| NEQAS | Do inglês “ <i>United Kingdom National External Quality Assessment</i> ” |

| | |
|------|---|
| PCT | Plaquetócrito |
| PFA | Estudos de Hemóstase Primária |
| PDW | Amplitude de anisocitose Plaquetar |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| RDW | Amplitude da Variação do Volume dos Eritrócitos |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| SEQC | Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratórios |
| SPC | Serviço de Patologia Clínica |
| SSPs | Pólipos Serrados Sésseis |
| TB | Tuberculose |
| TF | Fator Tecidual |
| TP | Tempo de Protrombina |
| TSA | Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos |
| TSH | Hormona Estimulante da Tireoide |
| ULS | Unidade Local de Saúde |
| VAL | Valina |
| VCM | Volume Corpuscular Médio |
| VGM | Volume Globular Médio |
| VPM | Volume Plaquetário Médio |
| VPP | Valor Preditivo Positivo |
| VS | Velocidade de Sedimentação Eritrocitária |
| VwF | Do inglês “ <i>Von Willebrand factor</i> ” |

Capítulo 1: Relatório de Estágio

1. Introdução

O relatório descreve a minha experiência de estágio no Serviço de Patologia Clínica na Unidade Local de Saúde do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (ULS CHUCB). O CHUCB é uma instituição de saúde localizada na cidade da Covilhã no distrito de Castelo Branco. Este integra a Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados e é conhecido por oferecer serviços de saúde de alta qualidade, bem como o seu importante papel na formação e investigação. A sua área de influência direta corresponde aos concelhos da Covilhã, Fundão, Belmonte e Penamacor.⁽¹⁾

Este estágio foi realizado no âmbito do 2º ano do Mestrado em Bioquímica, teve a duração de cerca de nove meses (cerca de 1200h horas) e foi dividido igualmente entre os três principais laboratórios do serviço: microbiologia, hematologia e imunoquímica, sendo estas áreas mais aprofundadas neste relatório.

Os laboratórios são essenciais no serviço de saúde, influenciando aproximadamente 70% das decisões médicas. O objetivo principal dos laboratórios clínicos é fornecer informações para detetar doenças, confirmar diagnósticos, estabelecer prognósticos, orientar a supervisão dos pacientes e acompanhar a eficácia de terapias. Além disso, os laboratórios desempenham um papel importante na educação, pesquisa, implementação de tecnologias e na melhoria da qualidade dos serviços de saúde.⁽²⁾

2. Caracterização do serviço de Patologia Clínica

O Serviço de Patologia Clínica passou a operar nas novas instalações do recém-inaugurado Hospital Pêro da Covilhã no ano de 2000, incorporando simultaneamente o serviço de Patologia Clínica do Hospital do Fundão. Ambos os hospitais fazem parte da estrutura do ULS CHUCB, este serviço abrange áreas como: hematologia, microbiologia, imunoquímica, virologia, autoimunidade e urgência entre outros.⁽³⁾ A equipa do SPC é composta por técnicos de diagnóstico e terapêutica, técnicos superiores, farmacêuticos patologistas clínicos, assistentes técnicos e técnicos administrativos. Vários tipos de amostras podem ser recebidos e tratadas neste laboratório, sendo colhidas de acordo com o Manual de Colheitas em diferentes contentores consoante o tipo de amostra e análise.

3. Laboratório de Microbiologia

No ambiente hospitalar, a fronteira entre a doença e a cura é muitas vezes determinada pelas minúcias do mundo microscópico. O laboratório de microbiologia surge como uma fortaleza estratégica, onde a batalha contra infecções assume um papel decisivos.

Este relatório de estágio realça o papel crucial desempenhado pelo laboratório de microbiologia do ULS CHUCB. A missão de todos os dias é clara: identificar patógenos, determinar perfis de resistência, e fornecer diagnósticos rápidos e precisos que orientem a terapêutica clínica. Trata-se de um compromisso com a segurança do paciente e a eficácia no tratamento.

Além do papel de diagnóstico, o laboratório de microbiologia hospitalar é um elemento essencial na vigilância epidemiológica, contribuindo para estratégias de controle de infecções hospitalares. Neste laboratório realizam-se análises bacteriológicas, micológicas, parasitológicas e micobacteriológicas nos diversos produtos biológicos que são entregues por diferentes serviços do hospital.

Durante os três meses que estive nesta secção pude seguir e participar na rotina deste laboratório. No dia a dia do laboratório de microbiologia, pude monitorizar a chegada dos produtos, assegurando que os mesmos estavam em condições adequadas para análise, seja durante o transporte ou no ambiente de cultivo. Se necessário, realizava testes adicionais ao passar por equipamentos automáticos. Além disso, participei na supervisão dos controles da secção e, por fim, na validação dos resultados que envolvia principalmente observar a bancada com as placas semeadas nos dias anteriores.

3.1. Análise Microscópica

A capacidade de observar microrganismos por microscopia e cultivá-los em laboratório permanece um procedimento importante nos laboratórios clínicos. Para muitas doenças, técnicas como esta ainda são os métodos definitivos para identificar a causa de uma infecção, como tal a microscopia é geralmente utilizada para dois propósitos principais: a deteção inicial de microrganismos e a identificação preliminar ou definitiva dos mesmos em amostras clínicas. A análise microscópica é utilizada para identificar células bacterianas, elementos fúngicos, parasitas e aglomerados de vírus presentes em células infetadas. Características morfológicas são usadas para a identificação de muitas bactérias e são essências para a identificação definitiva de vários fungos e parasitas. De modo a facilitar a análise microscópica as amostras podem ser fixa e coradas com corantes específicos, destinados a realçar organismos particulares ou componentes celulares.⁽⁴⁾

3.1.1. Coloração de Gram

No laboratório de microbiologia do ULS CHUCB é utilizado um equipamento automático de coloração Gram e Ziehl-Neelsen.

O PREVI® Color Gram (BioMérieux) é um sistema automatizado de coloração de Gram que garante resultados precisos e padronizados. Utiliza bicos de pulverização inovadores para dispensar consistentemente reagentes, evitando a contaminação cruzada, e oferece uma melhor diferenciação dos microrganismos do que métodos manuais.

A técnica de coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial porque, dependendo da estrutura da parede celular de uma bactéria, reage de maneira diferente a vários tipos de bactérias. As Gram-positivas depois de fixadas à chama são coradas com violeta de cristal (corante purpura) e iodo (mordente), estas fixam o corante e quando posteriormente se aplica o álcool (descoloração) ou acetona o corante não é removido. Estas bactérias com uma camada espessa e com uma grande percentagem de *cross-linkage* de peptidoglicanos mantém o corante e coram-se de roxo, já as bactérias que possuem uma camada fina de peptidoglicanos com uma percentagem menor de *cross-linkage*, seguida por uma segunda camada fina chamada membrana externa, não retêm o corante primário após o tratamento com álcool. Essas bactérias com parede celular fina são conhecidas como bactérias gram-negativas e são marcadas pela safranina. A coloração das bactérias gram-positivas e gram-negativas mostra a morfologia geral das células, permitindo uma classificação adicional das mesmas como bastonetes ou cocos.

Esta técnica é eficaz para classificação taxonômica e também para uma análise diagnóstica inicial de amostras de pacientes e avaliação da pureza das culturas. ⁽⁵⁻⁸⁾

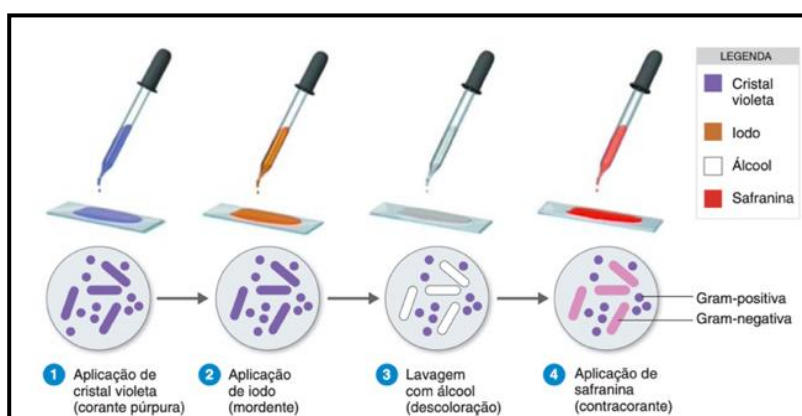


Figura 1: Procedimento da coloração de Gram.⁽⁶⁾

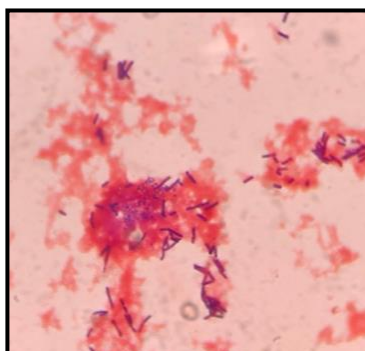


Figura 2: Imagem microscópica, coloração de Gram efetuada no laboratório de microbiologia.

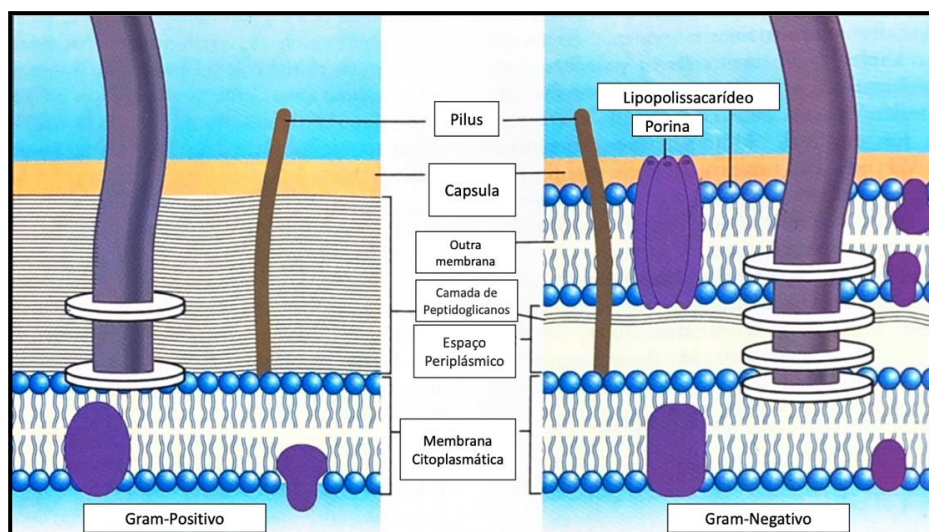


Figura 3: Figura adaptada do livro “*Medical Microbiology*”⁽⁴⁾ disponível no laboratório de microbiologia.

3.1.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

Na coloração de Ziehl-Neelsen também é utilizado um equipamento automático o Aerospray® TB Slide Stainer / Cytocentrifuge. Automatiza a coloração de amostras de fluidos corporais para facilitar a deteção de bacilos álcool-ácido resistentes, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, acaba por ser um equipamento bastante seguro para os utilizadores pois cora pela técnica de Ziehl-Neelsen sem os fumos perigosos ligados à fase de aquecimento tradicional.

A coloração é específica para bactérias que possuem uma camada cerosa nas suas paredes celulares. Esta técnica é utilizada para diferenciar entre diferentes espécies de B.A.A.R., como *Mycobacterium* e algumas espécies de *Nocardia*. As bactérias que resistem à ação de ácidos quando coradas com carbolfucsina e submetidas a tratamento com álcool-ácido, mantêm a sua

coloração em tons de rosa ou vermelho, pois retêm a coloração da carbolfucsina. Por outro lado, as bactérias não resistentes a ácidos quando coradas e tratadas da mesma maneira coradas com azul de metileno, apresentam uma coloração azul, pois perdem a coloração da carbolfucsina e passam a aceitar a coloração do azul de metileno. (7,8)

3.2. Técnicas de sementeira em meios sólidos

Para efetuar uma boa e correta sementeira em meios sólidos devemos garantir que utilizamos meios não desidratados, mas cuja superfície esteja seca e sem gotículas de condensação na tampa. Tendo como objetivos principais o isolamento de colónias puras, quantificação de colónias e realizar provas de identificação e suscetibilidade. (7)

Os meios sólidos em placa são semeados das diferentes maneiras:

Por quadrantes ou em roseta: Colocar uma pequena porção de produto num quadrante e proceder à sementeira com a ansa. O objetivo é a obtenção de colónias isoladas, ter o cuidado de não cruzar as estrias para reduzir o inóculo a cada estrias. Como podemos ver na figura 4.

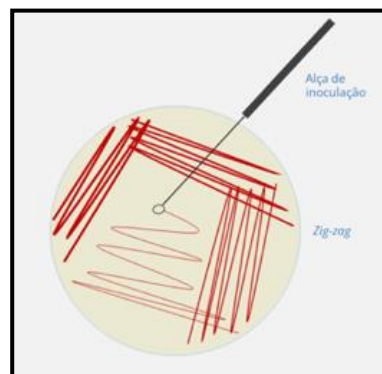


Figura 4: Ilustração da sementeira por quadrantes.

Por inundação: utilizando uma pipeta colocar uma pequena gota de produto e deixar espalhar.

Para quantificação de colónias: Utiliza-se uma ansa calibrada (1 µL) para efetuar estria simples que concite em fazer uma linha reta na placa seguida de zig-zag em toda a extensão da placa, como podemos ver na figura 5. Técnica utilizada em urinas.

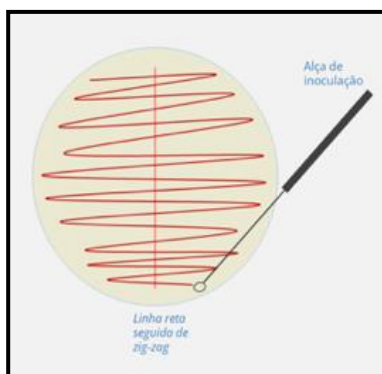


Figura 5: Ilustração da sementeira para quantificação.

Por espalhamento com zaragatoa: Útil para a execução de TSA por difusão em placas. Após efetuar a suspensão, passar com a zaragatoa na placa. ⁽⁷⁾

3.3. Meios de Cultura

O sucesso dos métodos de cultura é definido pela biologia do microrganismo, local da infecção, e pela resposta imunológica do paciente à infecção e também pela qualidade do meio de cultura utilizado. Em muitas infecções (por exemplo, gastroenterite, faringite, uretrite), o microrganismo responsável pela infecção estará presente entre muitos outros microrganismos que fazem parte da população microbiana normal do corpo humano. Foram então desenvolvidos muitos meios distintos que suprimem os micróbios normalmente presentes e permitindo assim uma detecção mais fácil dos microrganismos clinicamente importantes.

A imunidade inata e adaptativa do paciente pode suprimir o patógeno, por isso são frequentemente necessárias técnicas de cultura altamente sensíveis, contudo algumas infecções são caracterizadas pela presença de relativamente poucos microrganismos. Por exemplo, a maior parte dos pacientes sépticos tem menos de um microrganismo por mililitro de sangue, portanto a recuperação destes microrganismos numa hemocultura tradicional requer a inoculação de um grande volume de sangue em um caldo de enriquecimento. ⁽⁴⁾

3.3.1. Tipos de meios de cultura ^(4,7-10)

Os meios de cultura podem ser subdivididos em quatro categorias gerais: (1) meios não seletivos enriquecidos, (2) meios seletivos, (3) meios diferenciais e (4) meios especializados. Podem classificar-se em meios líquidos e meios sólidos, os meios líquidos não contêm ágar, permitindo uma maior disponibilização dos nutrientes, e os meios sólidos, por conterem ágar na sua


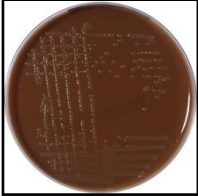
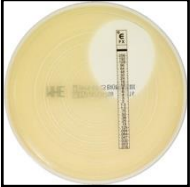
composição, permitem o isolamento e a contagem das colónias. O crescimento bacteriano em meios líquidos identifica-se pela turvação do mesmo, e no meio sólido pela presença de colónias.

Alguns exemplos desses meios estão resumidos nas tabelas 1 e 2 a seguir.

3.3.1.1. Meios não seletivos enriquecidos

Estes meios são projetados para apoiar o crescimento da maioria dos organismos sem requisitos exigentes de crescimento. A seguir estão algumas dos meios utilizados no laboratório de microbiologia do ULS CHUCB:

Tabela 1: Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do ULS CHUCB

| | | |
|--|--|--|
| <p>Gelose de Sangue (GS):</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio de isolamento especialmente designado para facilitar o crescimento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos, não seletivo. Bactérias Gram-Positivo e todas as outras espécies encontradas nas amostras clínicas. Permite a detecção de hemólise devido à presença de sangue de carneiro.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa de 37°C com 5% CO₂</p> <p>-24-48 horas</p> |
| <p>Gelose Chocolate + PolyVitex (PVX):</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio de isolamento de bactérias fastidiosas pertencentes ao género <i>Neisseria</i>, <i>Haemophilus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>. Este meio é composto por um nutriente base enriquecido com factor X (hemin) e V (NAD) fornecido pela hemoglobina e PolyVitex. Destina-se ao crescimento das estripes mais exigentes.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa de 37°C com 5% CO₂</p> <p>-24-48 horas</p> |
| <p>Gelose Müller-Hinton:</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio com sensibilidade aos antibióticos e sulfamidas. É destinado a antibiogramas por difusão em discos ou fitas. A sua composição permite o crescimento de bactérias não fastidiosas (<i>Enterobacteriaceae</i>, bacilos Gram-negativos não fermentadores, <i>Staphylococci</i> e <i>Enterococci</i>) detetados em patologias humanas.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa de 37°C com 5% CO₂</p> <p>-24-48 horas</p> |

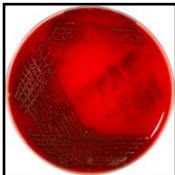

Meios líquidos:


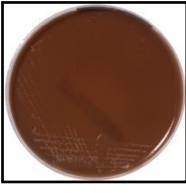

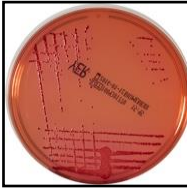
| | | |
|-----------------|---|---|
| Caldo de Carne: | Características: Trata-se de um meio líquido não seletivo destinado a cultura de anaeróbios, especialmente clostrídios patogénicos. Sustenta o crescimento da maior parte dos anaeróbios obrigatórios. Este meio também é útil como meio líquido enriquecedor para o apoio a meios em placa, ou para culturas que possam estar presentes em número reduzido numa população. O crescimento é indicado pela turvação e, em alguns casos, pela presença de bolhas de gás no meio. A desintegração ou o escurecimento das partículas de carne indicam proteólise. | Incubação: -Estufa de 37°C com 5% CO ₂ -7 dias |
|-----------------|---|---|



3.3.1.2. Meios seletivos e meios diferenciais

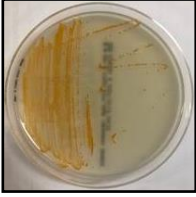
Os meios seletivos são projetados para a recuperação de organismos específicos que podem estar presentes em uma mistura de outros organismos (por exemplo, um patógeno entérico nas fezes). Os meios são complementados com inibidores que suprimem o crescimento de organismos indesejados. Esses meios podem ser diferenciados pela adição de ingredientes específicos que permitem a identificação de um organismo em uma mistura (por exemplo, adição de lactose e um indicador de pH para detetar organismos fermentadores de lactose).

Tabela 2: Alguns exemplos de meios seletivos e diferenciais

| | | |
|--|---|---|
| <p>Gelose de Sangue CNA:</p>  | Características: Trata-se de um isolamento seletivo de bactérias fastidiosas com deteção da hemólise. Permite o crescimento de bactérias gram-positivas. Muitas bactérias gram-negativas e <i>Bacillus</i> são inibidas pelo ácido nalidíxico e colimicina presente na gelose. | Incubação: -Estufa a 35°C ± 2°C + 5% CO ₂ -24-48 horas |
| <p>Gelose MacConkey:</p>  | Características: Trata-se de um meio com cristal violeta para o isolamento seletivo e de diferenciação para deteção de <i>Enterobacteriaceae</i> em amostras de origem diversa. Este meio destina-se especialmente à deteção da fermentação da lactose através da mudança de cor para vermelho neutro. Microrganismos que fermentam a lactose dão origem a colónias rosa ou vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliare. Os que não fermentam a lactose dão origem a colónias incolores ou ligeiramente beges. A seletividade para as bactérias Gram-positivas é fornecida pelos sais biliare e cristal violeta. | Incubação: -Estufa a 35°C ± 2°C + 5% CO ₂ -24 horas |

| | | |
|---|--|--|
| <p>Gelose Chocolate Haemophilus (HAE):</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio de isolamento para bactérias fastidiosas, seletivo para espécies de <i>Haemophilus</i> a partir de amostras polimicrobianas de origem humana proveniente das vias respiratórias ou do trato genital o que por vezes é difícil devido à presença de uma flora importante. A seletividade do meio é devido a agentes antimicrobianos e antifúngicos.</p> | <p>Incubação:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Estufa a 35°C ± 2°C + 5% CO₂ -24 horas |
| <p>Gelose Chocolate PolyVitex VCAT₃:</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio seletivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> a partir de amostras polimicrobianas (urogenitais, orofaríngeas, LCR e hemoculturas). É enriquecido, a sua seletividade é obtida pela combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos (VCAT= vancomicina, colistina, anfotericina e trimetopim). É utilizado nos Escudado vaginais.</p> | <p>Incubação:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Estufa a 35°C ± 2°C + 5% CO₂ -24 horas |
| <p>Gelose SS:</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio de isolamento seletivo e de diferenciação recomendado para a deteção das espécies <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>. O meio é incubado a partir de amostras de fezes, este deteta colónias que fermentam a lactose e reduzem o tiosulfato (produção de H₂S – sulfato de hidrogénio). Os microrganismos que fermentam lactose produzem colónias rosa, os outros dão colónias incolores. Microrganismos que produzem H₂S dão origem a colónias com um centro negro. As colónias de <i>Salmonella</i> são incolores ou amarelo-pálido, com ou sem centro negro, já as colonas de <i>Shigella</i> são incolores, rosa-pálido ou alaranjadas sem centro negro. Sais biliares e corantes inibem os gram-positivos.</p> | <p>Incubação:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Estufa a 35°C ± 2°C + 5% CO₂ -24-48 horas |
| <p>Gelose <i>Yersinia</i>:</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio de isolamento seletivo para a deteção e diferenciação de diversas espécies de <i>Yersinia</i> a partir de amostras de fezes. A fórmula do meio é a descrita por Schiemann (meio CIN: Cefsulodina, irgason, novobiocina). O manitol e o vermelho neutro presentes no meio permitem a diferenciação das <i>Yersinia</i> pela coloração das colónias (colónias rosa-escuro a vermelho). A presença de colato, desoxicolato, cristal violeta, irgason e antibióticos que inibe o desenvolvimento das bactérias gram-positivas e a maioria das gram-negativas.</p> | <p>Incubação:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Estufa a 30°C -24-48 horas |

| | | |
|--|---|--|
| <p>Gelose <i>Campylobacter</i>:</p> | <p>Características: Trata-se de um meio seletivo para o isolamento da <i>Campylobacter</i> intestinal (<i>C. jejune</i> e <i>C. coli</i>) principalmente a partir de amostras de fezes. Uma boa seletividade é assegurada pelos agentes antibióticos e antifúngicos presentes no meio que inibem a maioria dos contaminantes bacterianos e fúngicos. As colónias <i>Campylobacter</i> são pequenas e acinzentadas, e por vezes estendem-se ao longo das estrias de inoculação.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa a 40°C ± 2°C em um saco com uma atmosfera que permite microaerofilia</p> <p>-48 horas</p> |
| <p>Gelose Candida:</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio de isolamento seletivo de leveduras e identificação direta de <i>Candida albicans</i>. As colónias de <i>Candida albicans</i> apresentam uma coloração azul devido a hidrólise de um substrato cromogénico de hexosaminidase. A hidrólise de um segundo substrato (coloração rosa) diferencia culturas mistas e orienta a identificação de outras espécies.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa a 35°C ± 2°C</p> <p>-24 - 48 horas</p> |
| <p>Gelose Sabouraud:</p> | <p>Características: Trata-se de um meio seletivo recomendado para o isolamento de leveduras e fungos a partir de amostras polimicrobianas. Uma coloração para fungos, o aumento do nível de peptonas e dextrose favorece o crescimento de estripes fúngicas. A presença de gentamicina inibe bactérias gram-negativas e positivas. Cloranfenicol melhora a seletividade para certas espécies que podem ser resistentes à gentamicina (<i>Streptococci</i>, <i>Proteus</i>). O pH da gelose, que é ligeiramente acida, favorece o crescimento de fungos do que o crescimento de bactérias.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa a 35°C ± 2°C</p> <p>-24 - 48 horas</p> |
| <p>Gelose Manitol Salgado:</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio isolamento seletivo para <i>Staphylococci</i> em amostras humanas e orientação da identificação de <i>S.aureus</i>. Microrganismos que fermentam o manitol produzem colónias amarelas. É específico para <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa a 35°C ± 2°C numa atmosfera aeróbia</p> <p>-24 horas</p> |

| | | |
|--|---|---|
| <p>Gelose Granada:</p>  | <p>Características: Trata-se de um meio seletivo para o rastreamento de GBS (estreptococos do grupo B). Ajuda a prevenir a doença estreptocócica perinatal do grupo B através da detecção de todos os <i>Streptococci</i> (<i>S. agalactiae</i>) do grupo B. <i>Streptococcus</i> do grupo B (GBS), ou <i>S. agalactiae</i>, é uma bactéria gram-positiva que é normalmente assintomática em adultos. No entanto, nos recém-nascidos pode levar a graves problemas de saúde, que podem mesmo ser mortais, tais como septicemia, pneumonia e meningite. A <i>Streptococcus agalactiae</i> apresenta colônias laranjas enquanto a <i>Enterococcus faecalis</i> apresenta colônias incolores ou brancas.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa a 35°C ± 2°C numa atmosfera aeróbia</p> <p>-24 horas</p> |
| <p>Gelose Müeller Hinton + 5% de sangue de carneiro:</p> | <p>Características: Trata-se de um meio destinado a antibiograma por discos para estripes que necessitam de sangue para o seu desenvolvimento. A composição de MH, suplementada com sangue de carneiro permite o crescimento de bactérias como os <i>Pneumococci</i> e outras <i>Streptococci</i> garantindo um mínimo de interferência dos componentes da fórmula no resultado do antibiograma.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa a 35°C ± 2°C</p> <p>-24 horas</p> |
| <p>Gelose para a identificação de MRSA:</p> | <p>Características: Trata-se de um meio para a detecção e identificação definitiva de <i>S.aureus</i> resistente à meticilina. Dedicar-se a cultura de vigilância ou screening do MRSA para identificar doentes hospitalizados que requerem isolamento. O MRSA foi desenvolvido para responder a este grande problema de saúde (infecções nasais bacterianas). A identificação direta dos estripes de MRSA baseia-se na coloração verde das colônias que produzem alfa-glucosidase na presença de um antibiótico, a cefoxitina. A sua mistura seletiva inibe a maior parte das bactérias que não pertencem ao género <i>Staphylococcus</i>, assim como leveduras.</p> | <p>Incubação:</p> <p>-Estufa a 35°C ± 2°C</p> <p>-24 horas</p> |

| | | |
|---|---|---|
| Gelose SMAC CT (MacConkey com Sorbitol): | Características: Trata-se de um meio seletivo para o isolamento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7. Permite a detecção e a diferenciação da <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica do serotipo O157:H7, responsável por infecções ou afeções gastrointestinais. A <i>E. coli</i> I157:H7 caracterizam-se por colônias incolores com centro castanho e as outras <i>E.coli</i> que fermentam o sorbitol dão colônias rosa e vermelhas. A seletividade em relação as bactérias gram-positivas e a enterobactérias é assegurada pela cefixima, pelos sais biliares, pelo cristal violeta e pelo telurito. | Incubação: -Estufa a 35°C ± 2°C -24 horas |
|---|---|---|

Meios líquidos:

| | | |
|----------------------------------|---|---|
| Todd-Hewitt: | Características: Trata-se de um meio líquido seletivo utilizado principalmente como meio de crescimento de estreptococos beta-hemolíticos para utilização em testes serológicos. Este meio é altamente nutritivo devido ao seu conteúdo em peptonas, dextrose e sais. | Incubação: -Estufa de 37°C com 5% CO ₂ -24 horas |
| Lowenstein-Jensen (semi-sólido): | Características: Trata-se de um meio utilizado para o isolamento de micobactérias, contém glicerol, farinha de batata, sais e ovos inteiros coagulados (para solidificar o meio). Verde malaquita é adicionado para inibir bactérias gram-positivas. | Incubação: -Estufa de 37°C |

3.3.1.3. Meio especializado

Uma grande variedade de meios especializados foi criada para a detecção de microrganismos específicos que podem ser exigentes ou tipicamente presentes em grandes misturas de microrganismos.

3.4. Incubação, estufas e respetivas atmosferas

As condições de incubação para a cultura de microrganismos patogênicos em laboratório envolvem a criação de atmosferas específicas, como CO₂, microaerofilia e anaerobiose, com geradores de atmosferas disponíveis comercialmente. A temperatura ideal para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos é de 35-37°C, mas varia para alguns, como *Listeria spp.* (4°C) e *Campylobacter spp.* (42°C), é importante manter sempre uma temperatura estável. A maioria dos microrganismos prospera em uma humidade de 70% ou mais, e os meios de cultura devem permanecer hidratados durante a incubação, podendo-se usar recipientes com água para manter a humidade em uma estufa. (7,8)

No laboratório de microbiologia do CHUCB estão disponíveis quatro estufas em diferentes programações, duas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, uma a $31^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e outra a $41^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.5. Testes auxiliares à identificação de microrganismos e testes de sensibilidade aos antibióticos

3.5.1. Identificação baseada em características metabólicas

As provas bioquímicas para a identificação microbiana são baseadas principalmente na pesquisa de enzimas estruturais cruciais ao metabolismo do microrganismo como é o caso da fenilalanina desaminase, catalase, descarboxilases e citocromo C oxidase. Na pesquisa de produtos metabólicos e catabólicos tais como acetona, indol, ácidos orgânicos e também na avaliação da sensibilidade a diferentes compostos como bacitracina, optoquina e novobiocina. Atualmente, métodos automatizados das provas bioquímicas e redução no tempo de incubação são amplamente empregados de modo a facilitar a sua identificação precoce. Nestes sistemas, a seleção do conjunto de substratos é feita criteriosamente para permitir que resultados de provas positivas e negativas conduzam à identificação do patógeno sem grandes erros. Na maioria dos sistemas automatizados, diferentes conjuntos são oferecidos para identificar diversos microrganismos, agrupados por características semelhantes, tais como membros da família *Enterobacteriaceae*, cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos não fermentadores, bactérias anaeróbias estritas e leveduras. Testes adicionais para a identificação microbiana podem ser incluídos. ⁽¹¹⁾

Teste da Catalase

O teste da catalase utiliza peróxido de hidrogênio a 3%, sendo separado pela enzima catalase presente nas colônias estudadas, resultando na seguinte reação química:



O procedimento consiste em transferir a colônia para uma lâmina de vidro, adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio e observar imediatamente a formação de bolhas de ar (efervescência) como reação positiva. É necessária precaução, especialmente em culturas com mais de 24 horas, pois podem fornecer resultados falsos negativos. Este teste permite distinguir *Streptococcus spp.* (catalase negativo) de *Staphylococcus spp.* (catalase positivo). ⁽⁷⁾

Teste da Coagulase

Entre as três espécies de estafilococos patogênicos para humanos - *S.aureus*, *S.epidermidis* e *S.saprophyticus* A *S.aureus* é a mais significativa, principalmente devido à produção de coagulase, uma enzima que induz a coagulação do plasma. A coagulação ocorre pela ativação da protrombina, resultando na formação de trombina, que, por sua vez, catalisa a ativação de fibrinogênio, levando à formação de coágulo de fibrina. *S.epidermidis* e *S.saprophyticus* são conhecidos como estafilococos coagulase-negativos. O teste é realizado numa lâmina, colocando uma gota de suspensão EDTA na lâmina, é preciso ter o cuidado de fazer vortex dos reagentes pois podem estar sedimentados. Observar a existência ou não de aglutinação nos 10/15 segundos imediatos. ⁽¹²⁾

Teste da Oxidase

O teste do Citocromo Oxidase utiliza a tetrametil-*p*-fenilenediamina dicloridrato 1% como reagente para detetar a presença da enzima citocromo-oxidase em bactérias. Essa enzima atua como o último elo na cadeia de respiração aeróbia, transferindo hidrogénio para o oxigénio, formando água. O teste utiliza um corante que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénios, resultando no aparecimento de cor o procedimento pode ser direto em placa, aplicando o reagente sobre as colónias isoladas, ou indireto em tira de papel. A interpretação é baseada na formação de uma cor azul-roxo escura após 10 segundos de contacto com as colónias, indicando assim a presença da enzima. Uma limitação deste teste é a necessidade de evitar ansas de metal, pois os produtos de oxidação do metal podem causar falsos positivos. ⁽¹²⁾

Tipagem utilizando o PathoDX™ Strep Grouping Kit (Thermo Scientific™)

Utiliza-se este kit com o objetivo principal de detetar o *Streptococcus* β-hemolíticos segundo a classificação de Lancefield a partir de placas de cultura primária.

No procedimento PathoDx, um anticorpo específico em partículas de látex reage com o antígeno de grupo estreptocócico extraído da parede celular bacteriana, levando à aglutinação. Este teste destina-se a ser usado em colónias estreptocócicas que são beta-hemolíticas em ágar de sangue ou com isolados puros de estreptococos em culturas de caldo. ⁽¹³⁾

Teste da Optoquina

O teste da Optoquina utiliza uma placa de gelose GS e um disco de 5 µg de optoquina para avaliar a sensibilidade de *Streptococcus pneumoniae*. A optoquina inibe o crescimento desta bactéria resultando num halo de inibição na cultura observável na placa. O procedimento envolve semear uma colónia isolada do microrganismo em uma placa de gelose GS, colocar o disco de optoquina no centro e incubar a 35°C em CO₂ por 24 horas. A interpretação é feita

através da observação de um halo de inibição característico de pelo menos 19 mm, indicando assim a sensibilidade do *S. pneumoniae* à optoquina. ^(7,12)

Teste de suscetibilidade à Novobiocina

O teste de suscetibilidade à novobiocina é utilizado para diferenciar *Staphylococcus saprophyticus* de outras estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa com significado clínico. O *S.saprophyticus* é resistente à novobiocina (disco de 5µg), enquanto outras estirpes são suscetíveis. O procedimento envolve a preparação de uma suspensão das colónias em estudo, inocular numa placa de Muller-Hinton, colocar o disco de novobiocina e incubar. A interpretação é feita através da medição do halo de inibição ao redor do disco como tal, uma zona de inibição ≤16mm indica resistência e identifica presumivelmente a *S.saprophyticus*. ⁽⁷⁾

Teste da urease

A urease é uma enzima que quebra a ureia em amónio e dióxido de carbono, tal reação é aplicada na identificação de bactérias produtoras de urease. O amónio resultante vai reagir na solução, formando carbonato de amónio, o que torna o meio alcalino aumentando o pH, sendo assim a mudança de pH causa uma alteração na coloração do indicador de pH de amarelo para rosa. O teste é utilizado para distinguir *Proteus*, *Providencia rettgeri* e *Klebsiella pneumoniae* (urease positivo) de *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (urease negativo). ⁽¹¹⁾

Teste de sensibilidade aos antibióticos manualmente com discos de E-Test

Muitas das vezes a informação obtida pelos TSA não é suficiente, logo existe a necessidade de utilizar ETEST® (BioMérieux) são tiras de reagente pronto a usar que determina a CMI (Concentração Mínima Inibitória) em escala. O ETEST® é um gradiente predefinido estável de 15 concentrações antimicrobianas numa tira de plástico própria. Este tem uma vasta gama mais de 100 referencias de antimicrobianos disponíveis nas seguintes categorias: Antibióticos, Antifúngicos, Antimicobacterianos e Detecção de Resistência Antimicrobiana (ARD). O processo é simples, basta aplicar a tira em uma placa de gelose inoculada manualmente. Após a incubação, uma elipse intersecta a escala de leitura da CMI, indicando a concentração dos antibióticos que inibem o crescimento microbiano. Este valor é a CMI, útil na escolha de um tratamento adequado para o paciente. ^(7,14)

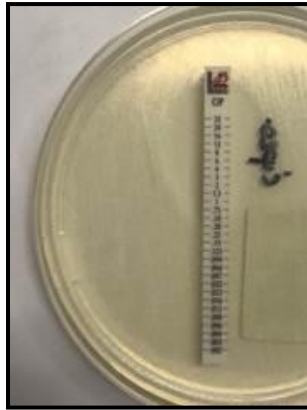


Figura 6: ETEST® (BioMérieux) em tira.

3.5.2. Testes Automáticos

VITEK®2 COMPACT (BioMérieux)

No laboratório de microbiologia do CHUCB o principal objetivo é a rápida identificação dos microrganismos. Para que este objetivo seja cumprido de uma forma rápida e eficaz o laboratório está equipado com o sistema automático VITEK®2 COMPACT (BioMérieux). Em termos gerais, o sistema VITEK®2 COMPACT utiliza a tecnologia de identificação automatizada baseada em cartas de identificação, o equipamento é capaz de realizar testes de identificação, testes de antibiograma e outros ensaios relacionados. O VITEK®2 COMPACT é simples de usar após isolar o microrganismo, requer um manuseio mínimo após o inóculo estar padronizado. O inóculo é colocado na cassete, a amostra e o cartão estão associados por código de barras. Estas cartas de identificação contêm diferentes substratos bioquímicos que permitem a identificação do microrganismo em questão. Este sistema também permite a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos de forma autónoma, as cartas de antibiograma específicas para o microrganismo têm diferentes concentrações de antibióticos liofilizados. Uma vez inserida a cassete, o instrumento controla a incubação e a leitura. Os resultados são resumidos em uma interface intuitiva e transmitidos para o sistema informático do laboratório *Modulab*.

(15)



Figura 7: VITEK®2 COMPACT (BioMérieux)

As cartas do VITEK®2 COMPACT disponíveis no laboratório são as seguintes:

Cartas de identificação (ID): ⁽¹⁶⁾

Tabela 3: Cartas de ID para o VITEK®2 COMPACT

| | |
|-----|---|
| GN | ID de bactérias Gram Negativas fermentadoras e não fermentadoras |
| GP | ID de bactérias Gram Positivas |
| NH | ID de <i>Neisseria spp.</i> , <i>Haemophilus spp.</i> e outras bactérias gram-negativas fastidiosas |
| YST | ID de leveduras e microrganismos similares |
| ANC | ID de bactérias anaeróbias e bactérias corineformes |

Cartas para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA): ⁽¹⁷⁾

Tabela 4: Cartas de AST para o VITEK®2 COMPACT

| | |
|----------|---|
| AST ST03 | Antibiograma de <i>Streptococcus</i> |
| AST N355 | Antibiograma de Bacilos Gram Negativos |
| AST YSo8 | Antibiograma de Fungos |
| AST N427 | Antibiograma de Bacilos Gram Negativos de relevância clínica contra antibióticos específicos |
| AST P586 | Antibiograma de <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp</i> e <i>S. agalactiae</i> |
| AST P648 | Antibiograma de <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp</i> e <i>S. agalactiae</i> com catalase positiva |
| AST XN22 | Antibiograma de Bacilos Gram Negativos |

Para a padronização do inoculo são utilizadas diferentes suspensões, as quais seguem a escala de MacFarland de acordo com as características do microrganismo em estudo, descrito na tabela seguinte: ⁽⁸⁾

Tabela 5: Densidade ótica para a padronização do inoculo.

| Microrganismos | Densidade ótica (escala de MacFardand) |
|------------------------------------|---|
| Leveduras | 0,55-0,70 |
| <i>Haemophilus</i> | 2,8-3,3 |
| <i>Streptococcus, Enterococcus</i> | 0,55-0,70 |
| Outros | 0,55-0,65 |

QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)

O teste QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) é uma tecnologia de quarta geração que avalia a resposta imunitária mediada por células, medindo quantitativamente o interferão-gama (IFN- γ) em uma amostra de sangue. Ele utiliza um cocktail de antígenos péptidos, com ESAT-6 e CFP-10, para simular proteínas das micobacterianas e deteta linfócitos que reconhecem esses antígenos. O teste é útil para diagnosticar a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com tuberculose ativa ou risco de infecção latente. Embora testes cutâneos de tuberculina e testes de IGRA sejam úteis, o QFT-Plus oferece vantagens, pois os seus antígenos não estão presentes em todas as estirpes de BCG e na maioria das micobactérias não tuberculosas, evitando assim resultados falsos positivos. No entanto, é necessário considerar outras avaliações clínicas para confirmar ou excluir a tuberculose, especialmente em casos de infecções por outras micobactérias.

No ensaio QFT-Plus, um resultado positivo é determinado pela presença de uma resposta de interferão-gama (IFN- γ) em qualquer um dos tubos de antígeno de tuberculose que seja significativamente superior ao valor de IFN- γ no tubo Nil em UI/ml. O tubo Mitogen funciona como um controlo positivo de IFN- γ para cada amostra testada. Uma resposta baixa ao Mitogen (<0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando a amostra também tem uma resposta negativa aos antígenos de tuberculose, o que pode ocorrer devido a vários fatores, como linfócitos insuficientes ou manuseamento inadequado da amostra. Níveis elevados de IFN- γ no tubo Nil podem resultar da presença de anticorpos heterófilos ou secreção intrínseca de IFN- γ . O intervalo de medição do ensaio QFT-Plus ELISA é no máximo 10 UI/ml. ⁽¹⁸⁾

Qvella Fast System (Fast PBC Prep Cartridge)

O objetivo deste equipamento é melhorar os resultados dos pacientes e salvar vidas através da redução do tempo de obtenção de resultados em microbiologia e dos testes a doenças infecciosas. O sistema automatizado FAST System foi projetado para isolar e concentrar células bacterianas

viáveis diretamente de uma hemocultura positiva produzindo uma colónia líquida limpa em aproximada 30 minutos através de um cartucho. Conseguindo-se assim efetuar identificação e TSA muito mais rapidamente. ⁽¹⁹⁾



Figura 8: Ilustração do procedimento do Qvella Fast System. ⁽²⁰⁾

MALDI-TOF MS (Bruker)

No tempo em que estive no laboratório de microbiologia esteve disponível o MALDI-TOF num período limitado para teste. A espectrometria de massa de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) é um método amplamente utilizado para identificar microrganismos em amostras clínicas por meio de espectrometria de massa. Essa aplicação tem se mostrado útil no diagnóstico e tratamento rápido de doenças infecciosas. Dispositivos comerciais, como o MALDI Biotyper (Bruker) e VITEK MS (bioMérieux), oferecem capacidades analíticas integradas para uma rápida identificação sendo estes uns ótimos aliados num laboratório de microbiologia clínica. A identificação de microrganismos através do MALDI-TOF MS é conveniente, rápida e precisa, além de ser económica, também revolucionou a identificação microbiana (ID). Na prática diária, amostras clínicas, como excreções brônquicas, pus, esfregaços e urina, são cultivadas em meio de crescimento para isolar microrganismos como colónias.

Os patógenos são avaliados com base em observações das colónias, informações clínicas do paciente, microscopia com coloração de Gram e contagem de microrganismos. A identificação dos microrganismos é posteriormente realizada utilizando o procedimento MALDI-TOF MS. O processo envolve transferir uma colónia para uma placa de amostra, sendo irradiada a laser após a adição e secagem da matriz. As proteínas ionizadas da bactéria geram um espectro de massa no espectrómetro, e esse espectro é comparado a uma base de dados para identificação bacteriana. O MALDI-TOF MS reduz o tempo de identificação de microrganismos para aproximadamente 1 dia, permitindo uma identificação mais rápida e possibilitando uma resposta clínica mais ágil, incluindo a implementação precoce das terapias. Para bactérias de crescimento rápido, o ID é possível no primeiro dia após a cultura ou dentro de 2 a 3 dias. Para bactérias de crescimento lento, o tempo de identificação é baseado na taxa de crescimento das mesmas. ^(21,22)



Figura 9: MALDI-TOF MS no laboratório de microbiologia do SPC.

3.6. Produtos Biológicos

3.6.1. Urinas

Este é o produto biológico mais comum no laboratório de microbiologia a colheita é realizada num contentor próprio esterilizado, sendo o primeiro jato descartado. Infecções do trato urinário são comuns e geralmente são causadas por bactérias intestinais, principalmente *Escherichia coli*. Em pacientes hospitalizados com fatores de risco, como cateterização, nefrostomia ou problemas no trato urinário, outros microrganismos como *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Enterococcus spp* e fungos podem estar envolvidos, especialmente em pacientes sob terapia antibiótica. ^(8,12)

Quanto a urina esta pode ser colhida de diferentes maneiras: ⁽⁷⁾

Urina colhida por micção “jato médio” - Deve ser obtida na primeira urina da manhã, efetuar a lavagem dos genitais externos, a coleta é feita diretamente em um recipiente esterilizado, descartando a primeira e última porção do jato urinário.

Urina colhida por punção de cateter urinário- O procedimento envolve a desinfecção do local, a aspiração da urina com uma agulha e seringa, sendo possível enviar a amostra na própria seringa, fechada com tampa esterilizada.

Urina colhida por punção supra-púbica- Envolve a desinfecção cirúrgica da pele, punção e envio da amostra na própria seringa, sendo indicado nos pacientes algaliados os quais a interpretação de resultados dos exames anteriores foi impossível e em crianças em que os outros métodos de coleta são impossíveis.

Urocultura: A sementeira é realizada utilizando uma ansa calibrada de 1 µL nos meios de cultura sólidos gelose Sangue e gelose MacConkey, usando o método semi-quantitativo e incubando por 18 a 24 horas a 35°C. Se houver suspeita de candidíase, também é feita a sementeira em gelose Candida, com incubação por 24 a 48 horas a 30°C. Geralmente é aceite uma contagem de pelo menos 100.000/mL de bactérias na urina esta condição é necessária para concluir que há uma bacteriúria significativa, especialmente em pessoas sem sintomas aparentes. Uma contagem de apenas 100/mL de bacterias pode ser significativa em pacientes sintomáticos. ^(8,12)

Sistema automatizado de análise de urinas: Uma alíquota de ± 10ml é inserida no equipamento automatizado Urina Atellica® 1500 (Siemens) que combina o Clinitek Novus Analyzer que tem a capacidade de tirar imagens digitais das urinas para conferir resultados consistentes e de alta qualidade como: (bilirrubina, clareza, cor, glicose, cetona, esterase leucocitária, nitrilo, sangue oculo, ph, proteínas e etc) o analisador Atellica UAS 800 é um analisador de sedimentos de urina totalmente automatizado projetado para minimizar a necessidade de microscopia manual. Este equipamento tem um rendimento de até 240 amostras por hora. ⁽²³⁾

Pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (B.A.A.R.): Uma alíquota de urina é centrifugada durante 10 min a 2000 rpm, em seguida realiza-se um esfregaço do sedimento da urina fixado pela técnica de citospin para realizar uma coloração Ziehl-Neelsen que posteriormente é vista pelo médico responsável, este é responsável pelo diagnóstico das micobactérias patogénicas tais como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*. ^(8,24)

Teste rápido para deteção de antigénios urinários para pesquisa de infeção por *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*: Utiliza-se o kit ImmuView®, que é um teste imunocromatográfico, que deteta anticorpos existentes na linha de teste. A linha de controlo é revestida apenas por anticorpos anti-IgG. ⁽²⁵⁾

3.6.2. Fezes

Este produto biológico também é recolhido em contentores específicos com uma quantidade aproximadamente ao tamanho de uma noz. Este pode ter vários pedidos para além da coprocultura como pesquisa de vírus e bactérias.

Coprocultura: A sementeira é realizada em quadrantes por esgotamento do produto, os meios utilizados são: gelose MacConkey e gelose SS incubadas a (± 35°C, 24h), gelose *Yersinia* incubada a (± 30°C, 24h), gelose *Campylosel* incubada a (±41 °C, 48h numa atmosfera de microaerofilia) e por fim em meio líquido de Tetrionato com lugol (± 35°C, 6h) sendo depois passado para gelose SS (± 35°C, 24h). ⁽⁸⁾

Teste rápido para sangue oculto: O motivo de aparecimento de sangue nas fezes pode ser por diferentes motivos como por exemplo o cancro do colón, pólipos, úlceras e fissuras. O teste

rápido NADAL® FOB test utilizado no laboratório de microbiologia é um teste cromatográfico para a deteção de hemorragias. Baseia-se na deteção de hemoglobina humana nas fezes.

Testes rápidos parasitológicos esquematizados na tabela 6 seguinte:

| | |
|---|--|
| CerTest BIOTEC- <i>Crypto-Giardia</i> : | Teste rápido para a pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> por meios de um imunoensaio cromatográfico em que os anticorpos são detetados. A amostra vai reagir com os anticorpos da fita. ⁽²⁶⁾ |
| StorAX SAF®: | Kit com o objetivo de concentrar a amostra para realizar uma análise microscópica, podendo observar parasitas (protozoários, ovos de larvas) se existentes na amostra. ⁽²⁷⁾ |

Testes rápidos para bactérias esquematizados na tabela 7 seguinte:

| | |
|---|---|
| CerTest BIOTEC- <i>Clostridium difficile</i> GDH + Toxin A + Toxin B: | É um imunoensaio cromatográfico colorido para a deteção qualitativa simultânea de <i>Clostridium difficile</i> Glutamato Desidrogenase (GDH), Toxina A e Toxina B em amostras de fezes. <i>C. difficile</i> é a causa mais comum de diarreia associada aos cuidados de saúde nos países desenvolvidos e é uma das principais fontes de mortalidade em todo o mundo. ⁽²⁸⁾ |
| Pylori-Strip Coris BioConcept: | Teste de imunocromatografia para deteção de antígenos de <i>Helicobacter pylori</i> em amostras de fezes humanas. Esta bactéria é a principal causadora de gastrite crónica e úlceras, alojando-se no estômago. ⁽²⁹⁾ |



Figura 10: Teste positivo para *Helicobacter pylori*.

Testes rápidos para vírus esquematizados na tabela 8 seguinte:

| | |
|---|---|
| RIDA®QUICK Norovírus: | O teste de norovírus é um teste imunocromatográfico qualitativo rápido para determinar norovírus em amostras de fezes. Os norovírus são vírus de RNA que causam gastroenterite. Eles são frequentemente associados a surtos em locais como lares de idosos e hospitais, além de casos esporádicos de gastroenterite. Os norovírus são responsáveis pela maioria dos casos de gastroenterite não bacteriana. ⁽³⁰⁾ |
| CerTest BIOTEC- Rotavírus e Adenovírus: | Teste imunocromatográfico para a detecção qualitativa simultânea de Rotavírus e Adenovírus. São a principal causa de gastroenterites graves em bebês e crianças, também é observado em adultos. Estes são transmitidos por contato fecal-oral dando sintomas como diarreia aquosa e vômitos. Com a ansa fornecida no kit uma amostra é retirada e colocada no tampão de extração, por fim são colocadas 4 cotas em casa poço correspondentes ao Rotavírus e Adenovírus. ⁽³¹⁾ |

3.6.3. Hemoculturas

A maior parte das doenças infecciosas podem decorrer como bacteremia transitória, intermitente ou persistente. Os microrganismos mais frequentemente isolados a partir de hemoculturas são dois cocos gram-positivos, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* e três bacilos gram-negativos, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir da hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção. É importante que o local de punção venosa esteja devidamente limpo assim como a zona do frasco onde a amostra é inserida com uma solução antisséptica para evitar contaminação. O volume de sangue colhido é muito importante isto porque a concentração de microrganismos é baixa na maior parte dos casos, principalmente se o doente estiver sob terapêutica antibiótica. Nos casos pediátricos o volume obtido é menor do que nos adultos visto que a concentração de microrganismos é mais alta nas crianças. Volume recomendado: Crianças 1 a 5 ml por punção venosa, nos adultos é de 10 a 30 ml por punção venosa.

São colhidas quatro garrafas por cada paciente duas por cada braço, duas garrafas para anaerobiose e duas garrafas para aerobiose, cada frasco deveser conter no mínimo 10 mL de sangue. O próximo passo é colocar as hemoculturas em incubação no aparelho BACT/ALERT® 3D (BioMérieux), este equipamento tem como função identificar a presença de bactérias ou leveduras através da alteração da cor (tecnologia colorimétrica) no fundo da garrafa. Esta alteração de cor é devido a alteração do pH que leva ao aumento do CO₂ produzido pelos

microrganismos existentes. Este sistema mede a cor em intervalos constantes de 10 minutos diminuindo assim os falsos positivos. Quando a hemocultura é positiva esta é retirada do equipamento para ser passada para meios sólidos, no caso das anaeróbias a sementeira é feita em gelose de Sangue incubada a (35°C, 24h em atmosfera de CO₂), gelose de Sangue incubada a (35°C, 24h em atmosfera de anaerobiose) e gelose MacConkey incubada a (35°C, 24h), caso seja aeróbia a sementeira é feita em gelose de Sangue incubada a (35°C, 24h em atmosfera de CO₂) e gelose MacConkey incubada a (35°C, 24h). Para todas as hemoculturas é feito a coloração Gram. Todo o processo deve ser realizado dentro da camara de fluxo laminar para que seja o melhor ambiente asséptico possível evitando contaminações. ^(8,12,32,33)

3.6.4. Aparelho Respiratório

As infeções respiratórias agudas podem ser divididas em infeções do trato respiratório superior e inferior, são das principais causas de morte em todo o mundo e frequentemente afetam as crianças e idosos mais vulneráveis. A maioria das pandemias e surtos devastadores são causadas por vírus respiratórios, resultando em infeções do trato respiratório inferior. Antes da COVID-19, o *Streptococcus pneumoniae* era identificado como o principal patógeno responsável pela mortalidade por infeções do trato respiratório inferior. ⁽³⁴⁾

3.6.4.1. Expetorações e Secreções Brônquicas

Quando a amostra chega ao laboratório o primeiro passo é fazer as lâminas pela técnica de esmagamento para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen com o objetivo de avaliar o numero de células epiteliais, polimorfonucleares e a observação de microrganismos presentes na coloração de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de B.A.A.R.. No exame cultural a sementeira é realizada por quadrantes nos meios gelose de Sangue incubada a (35°C, 24h em atmosfera de CO₂), no meio gelose de Chocolate *Haemophylus* incubada a (35°C, 24h). Caso o doente seja internado na unidade de cuidados intensivos (UCI) também se faz sementeira nos meios gelose Candida e Sabouraud que incubam a (30°C, 24h). Se for pedido pesquisa de B.A.A.R. separa-se a amostra para uma alíquota em frasco de centrífuga de 50mL e envia-se para o sector das Micobactérias. ⁽⁸⁾

3.6.4.2. Lavado Bronco-alveolar e Aspirado Brônquico

As amostras devem ser enviadas em recipientes esterilizados com tampa de rosca e hermético, marcados com a ordem da colheita (1º, 2º e 3º). Estas amostras são colhidas por broncoscopia. Da 1º amostra deve ser retirada a alíquota para a cultura de B.A.A.R., exterior e virologia caso seja pedido, a 2º amostra utiliza-se para o exame cultural e microscópico por fim a 3º amostra é encaminhada para a citometria de fluxo, se pedido. No caso de chegar apenas uma amostra faz-se tudo da mesma. Relativamente a sementeira do LBA, este deve ser agitado no vortex 30 a 60 segundos antes de semear. A sementeira é feita com uma ansa calibrada de 10 µL para contagem de colónias, no meio gelose PVX incubado a (35°C, 24h em atmosfera de CO₂), gelose de Sangue incubada a (35°C, 24h em atmosfera de CO₂) e gelose MacConkey incubada a (35°C, 24h). Após

semeado é necessário centrifugar a amostra durante 10 minutos a 2000rpm para realização das lâminas. Lâminas para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen por citospin.

Em relação aos Aspirados Brônquicos são processados da mesma maneira que as secreções e expetorações, diferenciando só em que é preciso concentrar a amostra por centrifugação durante 10 minutos a 2000rpms. ⁽⁸⁾

3.6.5. Catéter

O envio do cateter para exame bacteriológico é aconselhado apenas se houver sinais de infecção relacionada ao próprio cateter. Antes de retirar o cateter, é recomendado colher sangue para hemocultura (uma garrafa de aerobiose e uma de anaerobiose). A desinfecção da pele ao redor do cateter deve ser feita com um antisséptico conforme a política hospitalar. Ao remover o cateter, é indicado cortar assepticamente uma porção terminal de 3 a 5 cm e colocá-lo em um recipiente esterilizado. Pontas de cateter não devem ser enviadas em meio líquido ou de transporte. Caso o cateter seja enviado sem as hemoculturas este deve ser rejeitado. A sementeira é realizada por rolamento (técnica de Maki) do cateter em gelose de Sangue incubada (35°C, 24h em atmosfera de CO₂). ⁽⁸⁾

3.6.6. Aparelhos Genitais

3.6.6.1. Exsudado Vaginal e Uretral

Esta amostra tem de ser tratada rapidamente pois é efetuada a pesquisa da presença de *Trichomonas vaginalis*, esta tem de ser tratada o mais rapidamente possível ou então conservadas a 35°C para manter a viabilidade do microrganismo. Para se fazer o exame citológico a amostra deve estar a 35°C durante 30 minutos, após esse tempo a zaragatoa em carvão deve ser pressionada contra a lâmina e observar ao microscópio ótico para avaliar o número de células epiteliais, polimorfonucleares e a pesquisar *Trichomonas*. Para o exame cultural os meios utilizados são gelose de Sangue incubada a (35°C, 24h em atmosfera de CO₂), gelose PolyVitex VCAT incubada a (35°C, 48h em atmosfera de CO₂) e por fim em gelose Candida incubada a (30°C, 24h). ⁽⁸⁾

3.6.7. Exsudado Nasal

O exsudado nasal é utilizado principalmente para fins epidemiológicos, visando detectar portadores de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA). O procedimento envolve inserir uma zaragatoa estéril em cada narina até encontrar resistência, girar a zaragatoa contra a mucosa nasal, colocá-la em meio de transporte para ser enviada rapidamente ao laboratório. Este método é empregue para identificar e estudar a presença desta bactéria resistente em indivíduos. A zaragatoa é colocada em meio líquido de Todd-Hewitt que é incubada a (35°C,24h), após a incubação é realizada a sementeira em gelose MRSA que incuba a (35°C,24h). A pesquisa de *S. aureus* também pode ser efetuada por PCR. ⁽⁸⁾

3.6.7.1. Exsudado orofaríngeo

Concretiza-se o teste rápido para a pesquisa de *Streptococcus* beta-hemolíticos do Grupo A. Caso seja pedido o exame cultural a zaragatoa é colocada em caldo de carne que incuba a (35°C,24h) sendo posteriormente passado a gelose de Sangue incubada a (35°C,24h em atmosfera de CO₂).⁽⁸⁾

3.6.8. Produtos em zaragatoa

3.6.8.1. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

A pesquisa de *Streptococcus agalactiae* é feita por rotina a todas as grávidas às 35 semanas. Para tal é feita uma colheita de exsudado vaginal e outra de exsudado retal, as zaragatoas são colocadas em meio líquido de Todd-Hewitt que é incubado a (35°C,24h). O meio é repicado para gelose Granada, coloca-se uma lâmina sobre a sementeira e incuba a (35°C,24h em atmosfera de anaerobiose). Caso o *S. agalactiae* se encontre presente na amostra as colónias ficam laranjas no meio gelose Granada.⁽⁸⁾

3.6.8.2. Pesquisa de *Acinetobacter baumannii*

Bactéria bacilos Gram-negativa não fermentativa, capaz de causar infeções respiratórias e urinárias em pessoa que estejam medicadas por antibióticos ou a recuperar de cirurgias considerado infeções oportunistas. Esta pesquisa é feita através de uma zaragatoa retal em que o exame de cultura é feito em gelose MacConkey que incuba a (35°C,24h) e em caldo de carne que incuba na estufa a 35°C.^(7,8)

3.6.9. Líquidos Estéreis Biológicos

Os líquidos estéreis que normalmente chegam ao laboratório são líquidos pericárdico, ascítico (peritoneal) e sinovial. Como geralmente são estéreis qualquer microrganismo encontrado deve ser considerado importante. Para todos estes líquidos preparamos lâminas de coloração Gram e Ziehl-Neelsen.⁽⁸⁾

3.6.9.1. Líquido Pericárdico

Quando este produto chega ao laboratório de microbiologia deve ser concentrado por centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos rejeitando-se o sobrenadante e processa-se o sedimento. Como anteriormente referido preparam-se sempre duas lâminas para coloração Gram e Ziehl-Neelsen por citospin, para pesquisa de B.A.A.R.. No que diz respeito ao exame cultural a sementeira é realizada por quadrantes em gelose de Sangue que incuba a (35°C,24h em atmosfera de CO₂), gelose Chocolate *Haemophilus* que incuba a (35°C,24h) como a gelose MacConkey. E por fim preparar uma garrafa de hemocultura pediátrica, caso não seja possível colocar umas gotas em caldo de carne que incuba a (35°C, 24 a 48h). Em caso de ser uma amostra de líquido sinovial ou líquido articular a única diferença no processo de tratamento das amostras é que também se efetua a sementeira em meio gelose Sabouraud que incuba a (35°C,24h).⁽⁸⁾

3.6.9.2. Líquido Ascítico (Peritoneal)

Colocar sempre o produto em garrafa de hemocultura pediátrica, preparar lâminas para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen por citospin. Caso seja pedido separar uma alíquota da amostra em frasco de centrifugação de 50 mL e enviar para setor de micobactérias. Caso a hemocultura positive é passado para meio gelose de Sangue que incuba a (35°C,24h em atmosfera de CO₂) e gelose MacConkey que incuba a (35°C,24h).⁽⁸⁾

3.6.9.3. Líquido Articular/Sinovial

Quando entra no laboratório o produto deve ser concentrado por centrifugação a 2000rpm, durante 10 minutos rejeitando-se o sobrenadante e processasse o sedimento. Começamos pelo exame microscópico, preparam-se duas lâminas para coloração em Gram e Ziehl-Neelsen, se houver pesquisa de B.A.A.R.. Relativamente ao exame de cultura as sementeiras são feitas em gelose de Sangue que incuba a (35°C, 25h em atmosfera de CO₂), gelose PVX que incuba a (35°C, 25h em atmosfera de CO₂), gelose MacConkey que incuba a (35°C,24h) e gelose Sabouraud que incuba a (30°C,24h). Este líquido também é colocado em garrafa de hemocultura pediátrica ou em caldo de carne.⁽⁸⁾

Pode ser pedido o PCR Micobactérias, para realizar este PCR o líquido deve ser centrifugado e decantado deixando 1 mL caso tenha quantidade suficiente. A este 1 mL de sedimento/ amostra adicionamos 2 mL do sample reagente incluído no kit Xpert MTB/RIF e agitar vigorosamente. Por fim colocamos o cartucho no GeneXpert® equipamento de diagnostico molecular.⁽³⁵⁾

3.6.9.4. Líquido Cefalorraquidiano

A amostra é colhida para um tubo esterilizado, inquebrável, transparente de fundo cónico com encerramento hermético. É recomendada a colheita de 3 tubos devidamente numerados. O líquido deve ser enviado de imediato para o laboratório pois é considerado a amostra mais importante do laboratório de microbiologia, esta é trabalhada dentro da camara de fluxo laminar. A camara deve ser devidamente limpa segundo os passos mencionados no kit. O exame citológico é realizado em camara de contagem Nageotte. No que diz respeito ao exame cultural a sementeira é realizada em gelose de Sangue que incuba a (35°C,24-48h em atmosfera de CO₂) tal como a gelose PVX, gelose MacConkey que incuba a (35°C,24-48h) e gelose Sabouraud que incuba a (30°C,48h). Tal como os outros líquidos também é colocado em garrafa de hemocultura pediátrica ou em caldo de carne. O LCR também é semeado em meio líquido Lowenstein para B.A.A.R..⁽⁸⁾

3.6.10. Pús

A amostra pode ser enviada ao laboratório de diferentes maneiras, pode ser por pús em meio de portagerme ou pús em zaragatoa (2 zaragatoas). No caso de chegar em portagerme é necessário verificar se a anaerobiose se mantém, isto é possível pela alteração da cor do meio que fica azul em contacto com o oxigénio. Para processar a amostra deve desinfetar-se a tampa do frasco com álcool a 70%, utiliza-se uma seringa para retirar a amostra do frasco e coloca-se uma gota nos

meios e na lâmina para Gram. O exame cultura a sementeira é realizada em 2 meios de gelose de Sangue que incubam a (35°C, 24h em atmosfera de CO₂ e outro em atmosfera de anaerobiose), gelose MacConkey incuba a (35°C, 24h), gelose Cândida (30°C,24h), por fim colocar em caldo de carne. No caso da amostra enviada em zaragatoa uma é utilizada para realizar o Gram e outra o exame cultural. ⁽⁸⁾

3.6.11. Biópsia

A amostra é recebida dentro de um recipiente próprio estéril com uma membrana perfurante, ProbeAX (Axonlab®) este é composto por 10 esferas de aço inoxidável e 5 mL de solução salina fisiológica. O ProbeAX facilita e melhora a análise microbiológica de amostras de pacientes tais como, tecidos ou amostras intraoperatórias. Utiliza-se o IKA Ultra-TurrAX® Tube Drive para efetuar o esmagamento das amostras para ser utilizado no exame cultural. A cultura é realizada em gelose de Sangue que incuba a (35°C,24h em atmosfera de CO₂), gelose MacConkey que incuba a (35°C,24h) e caldo de carne (35°C,24-48h). Para o exame microscópico prepara-se uma lâmina de Gram. ^(8,36)

3.7. Testes de Biologia Molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que amplifica rapidamente pequenas amostras de DNA, produzindo bilhões de cópias a partir de um fragmento único em poucas horas. O processo envolve iniciadores complementares, nucleotídeos e a enzima DNA-polimerase. O teste de PCR deteta material genético de microrganismos, como bactérias ou vírus, ampliando uma pequena porção do seu material genético em um processo chamado amplificação. Isso facilita a detecção de patógenos, por vezes, antes do surgimento de sintomas, ajudando na prevenção da transmissão de infecções.

O laboratório de Patologia Clínica do CHUCB possui o GeneXpert®, uma plataforma de diagnóstico molecular automatizada e rápida desenvolvida pela Cepheid. Essa tecnologia é reconhecida por fornecer resultados precisos em um curto período, sendo valiosa em diversas aplicações de diagnóstico. Para preparar a amostra é necessário misturá-la com o tampão de inativação. Após esse paço uma certa quantidade de mistura é pipetada para o cartuxo que é específico para diferentes tipos de amostras. De modo a finalizar o cartuxo é introduzido no equipamento identificando o código de barras do paciente e do cartuxo que também é específico para cada teste e por fim aguardar pelo resultado do teste que ficara disponível no sistema informático do laboratório *Modulab*. ^(6,37,38)

3.7.1. Teste Xpert® MTB/RIF

Este teste tem como objetivo a detecção de *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina. Em 2019, cerca de 10 milhões de pessoas foram diagnosticadas com tuberculose globalmente, resultando em 1,4 milhões de mortes (14% em pessoas com HIV). A limitação da microscopia, com sensibilidade de apenas 46%-78%, destaca a necessidade de uma detecção mais eficaz para melhorar o tratamento e prevenir a transmissão da TB. O desafio atual é erradicar a TB,

exigindo métodos de detecção mais precisos e precoces. Através de uma amostra de expetoração o teste identifica o DNA de *M. tuberculosis* e também deteta mutações no gene *rpoB* que confere resistência ao antibiótico rifampicina. ⁽³⁹⁾

3.7.2. Teste Xpert® Carba-R

Utilizado para a detecção de bactérias Gram-Negativas não suscetíveis a carbapenemos. Bactérias frequentemente resistentes a vários antibióticos, incluindo beta-lactâmicos, apresentam desafios significativos no tratamento. Para otimizar a gestão de pacientes de alto risco, é crucial obter resultados precisos rapidamente especialmente antes ou durante o internamento. Os métodos tradicionais são demorados podem levar até 72 horas para fornecer resultados. Por outro lado, o Xpert® Carba-R é um teste de PCR rápido, preciso e de fácil utilização para enfrentar o desafio de controlar as infeções. Trata-se de um teste abrangente que deteta e diferencie famílias de genes de carbapenemases tais como (KPC, NDM, VIM, IMP-1, OXA-48, OXA-181 e OXA- 232) é essencial para um programa de controle de infeções eficaz. ⁽⁴⁰⁾

3.7.3. Teste Xpert® MRSA NxG

Estima-se que em todo o mundo, entre 2 e 53 milhões de pessoas são portadoras de MRSA. O teste Xpert® MRSA NxG foi desenvolvido para uma detecção rápida de MRSA em zaragatoas nasais em pacientes em risco. Com o objetivo principal da detecção da *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Com o passar do tempo a *S. aureus* foi desenvolvendo resistência a meticilina que é uma penicilina sintética. Uma rápida resposta ajuda a que haja uma diminuição do tempo de internamento melhorando a gestão de pacientes e camas nos hospitais. ⁽⁴¹⁾

3.7.4. Teste Xpert® CT/NG

A clamídia e gonorreia são as DSTs mais comuns, mas são tratáveis. Se não forem tratadas, podem levar a complicações como infertilidade, doença inflamatória pélvica e problemas durante a gravidez. O Xpert® CT/NG destina-se a detecção e diferenciação de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* de amostras de indivíduos assintomáticos e sintomáticos. As amostras podem ser recebidas de diferentes maneiras tais como urina, zaragatoa vaginal e zaragatoa endocervical. ^(42,43)

3.8. Visualização da Bancada

Todos os dias produtos são processados no laboratório, os resultados desses processos só podem ser visualizados e validados após o período estipulado de incubação. No laboratório de microbiologia do serviço de patologia clínica do CHUCB a primeira tarefa do dia é “preparar a bancada”, isto consiste na disposição das placas de petri semeadas no dia anterior para observação se houve crescimento ou ausência de crescimento bacteriano. A bancada é organizada por uma ordem específica de produtos semeados começando pelas urinas, produtos respiratórios, hemoculturas, pús e líquidos biológicos, coproculturas, MRSA e AGALACT e por fim placas de Vitek todas elas organizadas por número de identificação do doente. De acordo

com a observação de cada placa são determinados os passos seguintes, como: se ainda não existir crescimento suficiente as placas são então deixadas em incubação mais 24 horas, se existe contaminação da amostra esta é descartada e sugere-se uma nova colheita, caso sejam visualizados diferentes tipos de colónias é feito o isolamento das diferentes de maneira que se consiga obter culturas puras do possível agente causador da infeção. No caso de só se observar o crescimento de um único tipo de colónias é realizada a identificação (ID) e antibiograma (TSA) do microrganismo para conhecer o seu perfil de suscetibilidade e resistência aos antimicrobianos disponíveis. No caso das uroculturas que são as primeiras a ser observadas, nas que ocorre crescimento de mais do que dois microrganismos estes são considerados polimicrobianos e não se processa para estudo, sugerindo uma nova colheita/ amostra.

A observação da bancada é a alavanca de iniciação que orienta todo o estudo e testes que são necessários fazer para identificar o microrganismo em questão. ⁽⁸⁾

3.9. Controlo de qualidade do laboratório de microbiologia

O Controlo de Qualidade (CQ) é a monitorização contínua das práticas de trabalho, do equipamento e dos reagentes. É o próprio laboratório que faz a avaliação dos resultados/dados, também denominado Controlo de Qualidade Interno. O controle de qualidade interno abrange áreas fundamentais, incluindo o manual de procedimentos, manutenção e controle de equipamentos, e monitorização de meios de cultura e reagentes. Para um controle de qualidade eficaz é essencial que o laboratório microbiológico tenha acesso a uma variedade de estirpes microbianas de referência internacionalmente reconhecidas, também conhecidas como "estirpes de coleção" (ATCC - American Type Culture Collection, NCTC - National Collection of Type Cultures). Estas estirpes com características e comportamentos bem definidos, servem como referência ou controle do laboratório.

Na prática, a avaliação da qualidade envolve um sistema no qual amostras com conteúdo conhecido, mas não divulgado, são processadas no laboratório e examinadas da mesma maneira que as amostras dos pacientes/utentes que são rotineiramente analisadas. Os resultados obtidos são então comparados com os resultados esperados, que não foram previamente revelados. Esta avaliação dos resultados pode ser interna ou externa. No caso de ser uma avaliação interna é o próprio laboratório que cria amostras de controlo a partir de material biológico. Estas amostras são analisadas no próprio laboratório em momentos distintos ou por técnicos profissionais diferentes, os resultados obtidos são comparados para avaliar a confiança e a consistência. Alternativamente, as amostras podem ser enviadas a um laboratório de referência para comparação posterior dos resultados. No que diz respeito a avaliação externa é uma entidade externa ao laboratório de microbiologia do CHUCB que regularmente envia as amostras de controlo para serem examinadas e efetuar a avaliação dos resultados. ⁽⁸⁾

4. Laboratório de Hematologia

A hematologia exerce um papel fundamental na investigação e compreensão das condições que afetam o sangue e os seus componentes. Durante o período de estágio no laboratório de hematologia do CHUCB, foi possível experienciar de perto o papel essencial desempenhado por esta unidade na prestação de cuidados de saúde de grande qualidade. Esta parte do relatório destaca as aprendizagens adquirida ao longo do estágio nesta secção, explorando as principais funções do laboratório, as suas práticas operacionais e a contribuições para o diagnóstico e tratamento de distúrbios hematológicos.

O laboratório de hematologia baseia-se no estudo das células sanguíneas e na coagulação, envolve análises de concentração, estrutura e função das células sanguíneas, os precursores na medula óssea e os constituintes bioquímicos do plasma ou soro associados às células sanguíneas, abrange também a função das plaquetas e das proteínas envolvidas na coagulação sanguínea. Foi possível também observar que com o avanço das tecnologias e métodos de automação é possível aumentar a eficiência e precisão dos resultados, proporcionando informações cruciais para a tomada de decisões clínicas. O avanço das técnicas de biologia molecular tem permitido a deteção de mutações genéticas relacionadas a alterações estruturais e funcionais de células e proteínas, associadas a doenças hematológicas nomeadamente anemias, leucemias, linfomas e alterações ao longo da cascata de coagulação.

As amostras predominantes neste laboratório são sangue total que é colhido em um tubo de EDTA, estas amostras são utilizadas para analisar diversos parâmetros, exceto os fatores de coagulação que são obtidos através de um tubo de citrato de sódio pois requerem o plasma centrifugado.

Na secção de hematologia realizam-se hemogramas, análise da velocidade de sedimentação eritrocitária (VS), contagem total e diferencial de células em líquidos estéreis (pleural, peritoneais entre outros), contagem diferencial dos elementos da medula óssea, esfregaços de sangue periférico, imunofenotipagem por citometria de fluxo. Todos os dias no início do turno da manhã são passados controlos de qualidade em todos os equipamentos e efetuadas as devidas manutenções. ⁽²⁾

4.1. Análise Microscópica

4.1.1. Técnicas de coloração automatizada

A técnica de coloração automatizada em hematologia envolve o uso de equipamentos automatizados que podem ser conectados a analisadores hematológicos como o caso do Yumizen H2500 e Yumizen SPS Horiba Medical®, que cora lâminas preparadas automaticamente ou manualmente. O processo é semelhante à técnica manual de coloração e inclui um dispositivo que armazena 20 lâminas, levando cerca de 8 minutos para colorir uma lâmina sendo capaz de corar 40 lâminas em 1h. ^(44,45,46)

4.1.2. Coloração por May-Grunwald/Giemsa

A coloração May-Grunwald/Giemsa é utilizada para corar células do sangue periférico e envolve a aplicação sequencial de dois corantes diferentes. O corante May-Grunwald que contém eosina e azul de metileno, que por meio de reações químicas, resulta em eosinato de azul-metileno, cora os núcleos de azul e o citoplasma de vermelho-rosa. O corante Giemsa é utilizado para intensificar a coloração e destacar os elementos celulares. Ambos os corantes são da Sigma-Aldrich®. No laboratório de hematologia do CHUCB esta coloração é feita de forma automatizada pelo equipamento Yumizen SPS Horiba Medical ®. ^(2,45,47)

4.1.3. Coloração de Perls

É utilizado um kit HEMATOGNOST Fe® (Sigma-Aldrich®) de coloração para a detecção dos íons de ferro livres (Fe^{3+}) na medula óssea. O kit de coloração utiliza a reação de azul da Prússia em amostras hematológicas e histológicas para detectar ferro livre iônico, o kit contém todos os reagentes necessários para a sua detecção. A coloração destaca estruturas que sem a coloração teriam pouco contraste e seriam difíceis de distinguir no microscópio ótico, as imagens resultantes auxiliam os médicos a identificar melhor a forma e a estrutura das células em estudo.

Durante o decorrer da reação com azul de Prússia, o ferro iônico (Fe^{3+}) do grupo heme reage em solução de ácido clorídrico com o hexacianoferrato (II) de potássio, este vai precipitar sobre a forma de um sal insolúvel nos eritrócitos e noutras células como as da medula óssea ou de tecidos, sendo possível assim localizar o ferro livre nas células. ⁽⁴⁸⁾

4.1.4. Teste de Falciformação

A hemoglobina S (Hb S) está associada a doenças falciformes que resulta de uma mutação no cromossoma 11, onde um aminoácido neutro VAL (valina) é trocado por um aminoácido carregado negativamente GLU (glutamato). A anemia falciforme caracteriza-se pela forma de foice dos eritrócitos devido a esta troca de aminoácidos.

O teste de falciformação contribui para uma confirmação das anemias falciformes, o primeiro passo é colocar num tubo 50 μ L de sangue total mais 100 μ L de soro fisiológico e 100 μ L de metabissulfito de sódio a 2%. Neste passo fundamental, os glóbulos vermelhos encontram-se em condições de baixo oxigênio, o que desencadeia a sua transformação para uma forma de foice. Em seguida a lâmina é colocada em uma estufa a 37°C por uma hora, totalmente privadas de oxigênio. Após esse período examina-se a lâmina ao microscópio, sendo possível observar eritrócitos em forma de foice. ⁽⁴⁹⁾

4.2. Hematopoiese

A produção das células sanguíneas chama-se hematopoese, esta começa com uma célula-tronco que se pode dividir para se renovar a si mesma ou transformar-se em diferentes tipos de células. As células-tronco são raras e residem em locais exclusivos como na medula óssea, estas têm a

capacidade de se autorrenovar produzindo constantemente novas células sanguíneas. Com o avanço da idade, a quantidade de células-tronco vai diminuindo havendo assim um aumento de possíveis mutações genéticas, aumentando o risco de doenças e o desenvolvimento de cânceros. Sendo assim, as células-tronco respondem a vários sinais do corpo para que haja uma formação de diferentes tipos de células sanguíneas conforme necessário. ⁽⁵⁰⁾

4.3. Hemograma

O hemograma é um exame crucial para diagnosticar, monitorizar doenças e acompanhar tratamentos pois tem a capacidade de analisar variações quantitativas e morfológicas das células sanguíneas. Como tal este inclui os valores de hemoglobina, contagem de plaquetas, contagem de glóbulos brancos e índices hematimétricos. A automação deste exame melhorou a eficácia e confiança nos resultados laboratoriais, no entanto é essencial manter e controlar regularmente os equipamentos, utilizando sempre controlos estáveis e padronizados para garantir a qualidade em todas as fases do processo: pré-analítica, analítica e pós-analítica.

No laboratório de patologia clínica do CHUCB no serviço de hematologia é utilizado um analisador hematológico automático o Yumizen H2500 (Horiba Medical®) para a concretização dos hemogramas com capacidade de contagem de células sanguíneas, diferenciação celular, medição de índices hematológicos como o VCM e CHCM e parâmetros morfológicos quando acoplado ao CellaVision® DC-1 que foi projetado para simplificar a análise morfológica diferencial das células sanguíneas em laboratórios clínicos.

O princípio do método envolve diversas técnicas, como espectrofotometria para a quantificação da hemoglobina, que consiste no desvio da luz polarizada para distinguir elementos sanguíneos através da complexidade celular, e a impedância para demonstrar o volume celular através do impedimento da passagem de eletricidade. Os equipamentos automatizados mais avançados utilizam diferentes canais com impedâncias específicas que possibilitam a contagem simultânea de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, incluindo recursos como citometria de fluxo, citotóxica e citologia diferencial para distinguir células imaturas sanguíneas. ^(44,51)



Figura 11: Yumizen H2500 (Horiba Medical®) laboratório de hematologia.

4.3.1. Eritrograma

O eritrograma é uma análise sanguínea que avalia os glóbulos vermelhos, este é uma célula de grande importância fisiológica pois é responsável por transportar o oxigênio dos pulmões para os tecidos. Este exame integrante do hemograma, fornece informações cruciais sobre a saúde das células sanguíneas. Alguns dos principais parâmetros analisados incluem a hemoglobina (proteína responsável pelo transporte de oxigênio), o hematócrito (proporção de volume ocupado pelos glóbulos vermelhos), a contagem total de glóbulos vermelhos, o volume corpuscular médio (tamanho médio dos glóbulos vermelhos) ou VCM, a hemoglobina corpuscular média (quantidade média de hemoglobina por glóbulo vermelho) ou HCM e a concentração de hemoglobina corpuscular média (concentração média de hemoglobina em um volume dado de glóbulos vermelhos) ou CHCM. Estes parâmetros fornecem informações importantes sobre a saúde dos glóbulos vermelhos e ajudam a diagnosticar condições como anemias, policitemias, e outras doenças relacionadas com o sangue.

A interpretação dos resultados do eritrograma é realizada por profissionais de saúde, como médicos e hematologistas que consideram os valores normais específicos para idade, sexo e outros fatores individuais do próprio paciente. ⁽⁴⁴⁾

4.3.2. Eritrócitos

Os eritrócitos considerados normais são discos bicôncavos com 7 a 8 μ de diâmetro, são as células mais abundantes no sangue periférico. É composto principalmente por hemoglobina, desempenham a função crucial de transportar oxigênio e dióxido de carbono, a biconcavidade aumenta a superfície de contato facilitando as trocas gasosas. Obtêm energia pela via glicolítica de Embden-Meyerhof e têm aproximadamente 120 dias de vida antes de serem destruídos pelos macrófagos no baço. A flexibilidade do eritrócito é devido ao seu citoesqueleto que é composto por uma membrana de dupla camada lipídica ligada por proteínas transmembranares, como a proteína 3 e as glicoforinas sendo a espectrina a proteína mais importante. ⁽⁴⁴⁾

4.3.3. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) o principal componente do eritrócito, é uma molécula globular composta por duas subunidades alfa (α_1 e α_2) e duas subunidades beta (β_1 e β_2), cada uma associada a um grupo heme que contém ferro. Logo, uma molécula de Hb é composta por dois pares de cadeias polipeptídicas e quatro grupos prostéticos heme, cada com um átomo de ferro ferroso (Fe^{2+}). O ferro tem a capacidade de se combinar reversivelmente com o oxigênio, sendo a função principal da hemoglobina o transporte de oxigênio. Quando cada grupo heme está ligado a uma molécula de O_2 , a Hb denomina-se de oxi-hemoglobina. Quando o ferro é oxidado ao seu estado férrico (Fe^{3+}) a molécula perde a capacidade de transportar o oxigênio e dióxido de carbono. A forma mais comum é a HbA sendo 94% a 98% da hemoglobina no adulto, logo um adulto normal possui cerca de 600g de Hb, capaz de transportar 800mL de oxigênio.

A avaliação da hemoglobina em g/dL no sangue é usada para diagnosticar anemias, e os índices hematimétricos (HCM e CHCM) medem as concentrações intracelulares de Hb. ⁽⁴⁴⁾

4.3.4. Hematócrito

O hematócrito (Htc) trata-se da proporção do volume total de eritrócitos em relação ao volume total da amostra de sangue, expresso em porcentagem. Pode ser calculado indiretamente multiplicando o volume corpuscular médio (VCM) pela contagem de eritrócitos ou determinado diretamente através de métodos automatizados. É um exame crucial na avaliação, quando há suspeita de um doente anêmico ou se sofre de desidratação, perda de sangue ou outras condições médicas. ⁽⁴⁴⁾

4.3.5. Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM foram introduzidos por Wintrobe e continuam a ser utilizados na classificação de anemias. Estes índices são derivados da contagem de eritrócitos, do hematócrito e da dosagem de hemoglobina. Além disso, o RDW (distribuição do tamanho das hemácias) outro índice hematimétrico, é fornecido por contadores hematológicos automatizados. É essencial observar a concordância entre os níveis hematimétricos e os índices eritrocitários, correlacionando-os com o estudo do esfregaço em casos de alterações.

O VCM, volume médio dos eritrócitos, está relacionado com alterações no tamanho dos eritrócitos e é expresso em femtolitros (fL) com valores normais entre 80 a 98fL. Hemácias com tamanho inferior a 80fL são consideradas microcíticas, enquanto aquelas com tamanho acima de 98fL são classificadas como macrocíticas.

O HCM analisa a quantidade (peso) média de hemoglobina presente em cada eritrócito. Os resultados são expressos em picogramas (pg), com valores normais entre 28 e 33pg. Hemácias com HCM abaixo de 28pg são consideradas hipocrômicas, enquanto aquelas com HCM acima de 33pg são classificadas como hiperocrômicas.

O CHCM quantifica a quantidade de hemoglobina presente em 100mL de eritrócitos, permitindo avaliar o grau de saturação da hemoglobina na célula. Quando combinada com a HCM, o CHCM classifica as hemácias como normocrômicas, hipocrômicas ou hiperocrômicas. Os resultados são expressos em decilitros (g/dL), e os valores normais variam de 32 a 35g/dL.

O RDW representa a variação no tamanho dos eritrócitos. Ele indica o grau de anisocitose, ou seja, a variação no tamanho das células vermelhas. O RDW é útil para distinguir diferentes tipos de anemias. Pois um RDW elevado pode indicar a presença de diferentes condições, como anemia ferropênica, anemia megaloblástica, anemia hemolítica, deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico, entre outras. Por outro lado, um RDW baixo pode ser indicativo de anemia por deficiência de ferro ou talassemia. Os resultados são expressos em porcentagem (%), e os valores normais ficam entre 11% e 15%. ⁽⁴⁴⁾

4.3.6. Reticulócitos

Os reticulócitos são células vermelhas do sangue imaturas que ainda contêm vestígios de RNA ribossômico, mas não possuem núcleo. A capacidade de sintetizar hemoglobina após a perda do núcleo é uma característica das células vermelhas do sangue, e não especificamente dos reticulócitos. As células imaturas que antecedem o reticulócito, são cronologicamente o pró-eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático e o eritroblasto ortocromático. No processo de maturação o núcleo é progressivamente condensado e o eritroblasto ortocromático é expulso para fora do citoplasma, dando origem a última célula imatura o reticulócito. Sendo assim, os reticulócitos são eritrócitos jovens, recém-libertados pela medula óssea. Estes permanecem na medula durante 24h a 48 horas antes de serem libertados para a corrente sanguínea. Com esta informação é possível distinguir entre anemias hipoproliferativas e anemias hiperproliferativas.

Ao corar o sangue com corante azul-de-metileno ou azul de cresil brilhante, o RNA residual forma um complexo corante-ribonucleoproteína. Esse complexo pode ser observado ao microscópio como uma rede (retículo ou fibras filamentosas) azul-escura, ou pelo menos como dois grânulos azul-escuros, permitindo a identificação e contagem dos reticulócitos. Os valores normais de reticulócitos em adultos variam de 0,5% a 1,5%, ou 24 a 84 x 10⁹ células por litro. Em recém-nascidos, a percentagem de reticulócitos é mais elevada, situando-se entre 2,5% e 6,5%. Contudo, ao final da segunda semana de vida, esses valores diminuem para níveis semelhantes aos encontrados em adultos. ⁽²⁾

4.4. Leucograma

O leucograma é uma parte do hemograma que analisa a quantidade total de leucócitos (glóbulos brancos) no sangue, além de fornecer uma fórmula diferencial que quantifica e avalia morfológicamente os diferentes tipos de leucócitos presentes, sendo estes linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Os leucócitos desempenham um papel crucial no sistema imunológico, combatendo infecções e outras condições patológicas. ⁽⁵²⁾

4.4.1. Leucócitos

Os leucócitos são divididos em polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e monomorfonucleares (linfócitos e monócitos). Os granulócitos referem-se aos polimorfonucleares, enquanto agranulócitos incluem linfócitos e monócitos. Estas células fazem parte do sistema imunológico e combatem microrganismos e substâncias estranhas no organismo. Os leucócitos movem-se através dos tecidos por diapedese, localizando assim áreas danificadas ou infetadas, apresentam variabilidade em tamanho e forma, agindo independentemente fagocitando microrganismos. Geralmente, encontram-se 4.000 a 11.000 leucócitos/mm³ no sangue periférico um aumento nos níveis de leucócitos serve como marcador de ativação imunológica e inflamação no organismo. ⁽⁴⁴⁾

4.4.2. Neutrófilos

O neutrófilo é o leucócito mais prevalente em condições normais, representa 70% dos leucócitos num adulto. Possui um diâmetro de 12 a 15µm e uma vida média de 6 a 9 horas no sangue e 5 dias nos tecidos. O núcleo tem uma aparência de bastão ou é dividido em 2 a 5 lóbulos ligados por filamentos de heterocromatina. O citoplasma tem uma reação neutra a corantes hematológicos, e contém numerosos grânulos pequenos que possuem enzimas oxidativas para a destruição de microrganismos, além de enzimas hidrolíticas que digerem partículas fagocitadas. (44)

4.4.3. Eosinófilos

Os eosinófilos, têm um diâmetro um pouco maior que os neutrófilos (12 a 17µm), possuem uma vida média de 4 a 8 horas no sangue periférico e até 12 dias em condições normais nos tecidos, pele, glândulas e útero. A função dos eosinófilos inclui modular as respostas inflamatórias em reações alérgicas e a produção de vários mediadores, como interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimento, leucotrienos, histaminases e aril sulfatase B. São atraídos para as áreas inflamadas por mediadores químicos liberados por diferentes tipos celulares presentes nesses locais. A sua ação defensiva envolve a liberação do conteúdo dos grânulos no meio extracelular e a liberação de mediadores químicos no local. Os valores de referência dos eosinófilos ficam entre 1% e 7%. (44)

4.4.4. Basófilos

Os basófilos são leucócitos com baixo valor de referência no sangue periférico (cerca de 0% a 2%) e um tamanho de aproximadamente 10 a 15µm. O seu núcleo em condições normais geralmente não possui mais que dois lobos e é mais escuro por granulações densas e escuras no citoplasma, compostas por mucopolissacarídeos ácidos, histamina, heparina, serotonina e peroxidase. Os basófilos desempenham um papel importante em reações de hipersensibilidade imediata, participando em processos alérgicos ao produzir histamina e heparina. Essas células possuem recetores para imunoglobulina E (IgE). (44)

4.4.5. Linfócitos

Os linfócitos são classificados em três tipos: linfócitos B, linfócitos T e linfócitos NK (exterminadores naturais). No sangue periférico a percentagem de linfócitos B varia de 5% a 15%, a de linfócitos T de 75% a 85%, e a de linfócitos NK de 5% a 10%. Os linfócitos NK têm como principal função a destruição de células infetadas por vírus, induzindo-as à apoptose. A característica principal do linfócito B é a síntese de imunoglobulinas, já os linfócitos T têm origem na medula óssea, mas migram para o timo em estágios iniciais para a sua maturação celular. Após a maturação no timo, os linfócitos T dividem-se em dois tipos: linfócitos T auxiliares (CD4) e linfócitos T citotóxicos/supressores (CD8). O tamanho médio dos linfócitos é de 10 a 12µm. (44)

4.4.6. Monócitos

Os monócitos são as maiores células no sangue periférico com diâmetro entre 15 a 18µm, apresentam um núcleo irregular, muitas vezes lobulado, em forma de rim ou em "U", com a cromatina menos condensada. As principais funções dos monócitos incluem a fagocitose e integração na imunidade celular e humoral. Com origem na medula óssea como outros leucócitos, estes permanecem no sangue periférico por apenas 8 a 18 horas, saindo dos vasos sanguíneos e diferenciando-se em macrófagos. Estas células apresentam grande mobilidade e poder de fagocitose. No citoplasma dos monócitos existem grandes quantidades de ferritina em depósitos. O valor de referência para os monócitos no sangue periférico é de 4% a 12%.⁽⁴⁴⁾

4.5. Plaquetograma

Os parâmetros plaquetários são cruciais para diagnosticar e tratar doenças hematológicas. Fornecidos por equipamentos automatizados, incluem contagem de plaquetas, volume plaquetário médio (VPM), plaquetócrito (PCT) e amplitude de distribuição das plaquetas (PDW). Valores normais incluem VPM de 6,5 a 9,5 fL, PDW de 15,2 a 17,7 (razão) e PCT de 0,152% a 0,338% e uma contagem de plaquetas de 150.000 a 450.000 plaquetas por microlitro de sangue.⁽⁴⁴⁾

4.5.1. Plaquetas

As plaquetas, têm um diâmetro de 1 a 3µ e são originadas do citoplasma dos megacariócitos na medula óssea, cada megacariócito produz cerca de 3.000 plaquetas. Em condições normais, as plaquetas têm uma vida média de aproximadamente 10 dias e são removidas pelo sistema reticuloendotelial do baço e do fígado. Elas têm uma forma de disco e carecem de núcleo, mas contêm mitocôndrias, grânulos com diferentes densidades e glicogênio para obtenção de energia. Os valores normais variam de 150.000 a 450.000 plaquetas/mm³ no sangue periférico, aproximadamente dois terços das plaquetas circulam na corrente sanguínea, enquanto o restante está no baço.

Os grânulos das plaquetas são compostos por dois tipos principais: os grânulos densos, que contêm serotonina, cálcio, ATP e ADP, e os grânulos alfa, que contêm fator plaquetário 4, fibrinogênio e tromboglobulina beta. Além disso, lisossomas com hidrólases ácidas também estão presentes nas plaquetas para que haja um bom funcionamento das mesmas.

A função das plaquetas na hemostasia primária inicia-se quando há ruptura de um vaso sanguíneo. O fator de von Willebrand adere ao sub-endotélio, servindo como ponte para a adesão plaquetária através das glicoproteínas presentes na membrana plaquetária. Esse processo é essencial para manter a integridade dos vasos sanguíneos e iniciar a resposta de coagulação.⁽⁴⁴⁾

4.6. Velocidade de sedimentação eritrocitária

No laboratório de hematologia do CHUCB é utilizado um equipamento automático para a medição de VS (velocidade de sedimentação) o Sediplus® S 2000 (SARSTEDT). Este faz a medição através da transmissão infravermelhos com a diferença de altura entre a superfície líquida do plasma e a superfície de sedimentação dos eritrócitos.

Os valores de sedimentação do sangue venoso são medidos em tempos definidos, convertidos para milímetros e expressos em milímetros por hora (mm/h) usando o método padronizado de Westergren após 1 hora. Durante o processo de sedimentação sanguínea, os eritrócitos sedimentam-se de maneira mais rápida devido à sua maior densidade em comparação com o plasma sanguíneo. Em casos de doenças inflamatórias, o aumento do teor de proteínas provoca uma sedimentação mais acelerada dos eritrócitos.

Para determinar a taxa de sedimentação, utiliza-se sangue anticoagulado com solução de citrato, que é colocado em uma coluna padronizada (pipeta de sedimentação). Após uma hora, é então medida pelo equipamento a distância percorrida pelos eritrócitos em direção descendente, expressa em milímetros. ⁽⁵³⁾



Figura 12: Sediplus® S 2000 (SARSTEDT) laboratório de hematologia.

4.7. Análise de Hemoglobina Glicada, A2 e Fetal

A hemoglobina glicada (HbA1c) é uma forma de hemoglobina que sofre glicosilação pós-traducional, ligando os açúcares a resíduos específicos de aminoácidos. Cerca de 5% da hemoglobina A (HbA) passa por este processo resultando nas formas HbA1a (<1%), HbA1b (<2%) e HbA1c (3%). A glicosilação vai aumentando ao longo dos 120 dias de vida dos eritrócitos. No caso da HbA1c, a glicose não se liga enzimaticamente, acabando assim por refletir os níveis médios da glicose dos últimos 2 a 3 meses. Em pacientes com diabetes mellitus, os níveis de HbA1c são elevados sendo estes utilizados como indicador do controle metabólico da doença.

Este tipo de análises são efectuadas por um analisador automático de GlicoHemoglobina, o ADAMSTM A1c HA- 8180T (ARKRAY) em amostras de sangue-EDTA. Este equipamento utiliza a tecnologia de cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC) que efetua a medição por base numa troca aniónica de fase reversa. Automaticamente, quatro microlitros de sangue total são retirados, hemolisados e injetados na coluna as moléculas de hemoglobina são separadas utilizando tampões de fosfato inorgânicos com diferentes polaridades (80A, 80B e 80CT). Após a separação, os componentes da amostra passam por um detetor fotométrico que monitoriza as frações através da deteção em dois comprimentos de onda (420 nm e 500 nm).

É atualmente o método mais elegido para investigar variantes da hemoglobina, separar e determinar as percentagens das hemoglobinas A, A2 e F. ^(2,54,55)



Figura 13: ADAMSTM A1c HA- 8180T (ARKRAY) laboratório de hematologia.

4.8. Hemostase

A hemostase, processo de interrupção de hemorragias, ocorre no compartimento vascular revestido pelo endotélio. O processo é dividido em três fases, primária, secundária e terciária. Envolve diversos fatores, incluindo o próprio vaso sanguíneo (endotélio), plaquetas, proteínas plasmáticas (fatores da coagulação) essenciais à formação do coágulo, granulócitos e monócitos. A fase terciária inclui a fibrinólise (dissolução do coágulo) e proteínas anticoagulantes (regulação). Estes sistemas proteicos operam em equilíbrio para manter a hemostasia normal e prevenir a trombose. Podem-se dividir os distúrbios da coagulação em distúrbios hemorrágicos e trombóticos.

O laboratório de hematologia direciona os testes de hemostase segundo esses dois estudos. No estudo de distúrbios hemorrágicos realizam-se o hemograma (plaquetas), estudos de hemóstase primária (PFA) e estudos de proteínas plasmáticas (fatores da coagulação). No laboratório de hematologia do CHUCB é utilizado um equipamento para a deteção rápida e confiável de disfunção plaquetária, o sistema INNOVANCE PFA-200 (SIEMENS) mede o processo de homeostase primária e auxilia na deteção de disfunção plaquetária. Funciona simulando a

formação de um tampão plaquetário numa ferida vascular, utiliza citrato de sódio como anticoagulante. Tal processo é alcançado aplicando-se forças de cisalhamento a uma amostra de sangue através de um pequeno orifício em uma membrana. A formação do tampão plaquetário é monitorada por sensores, e o tempo necessário para a oclusão do orifício é medido. Os resultados ajudam a identificar distúrbios plaquetários e a avaliar a eficácia da terapia antitrombótica. É fácil de usar e fornece resultados rápidos, sendo essencial em procedimentos cirúrgicos, distúrbios hemorrágicos e monitorização de doenças cardiovasculares. (2,56,57)

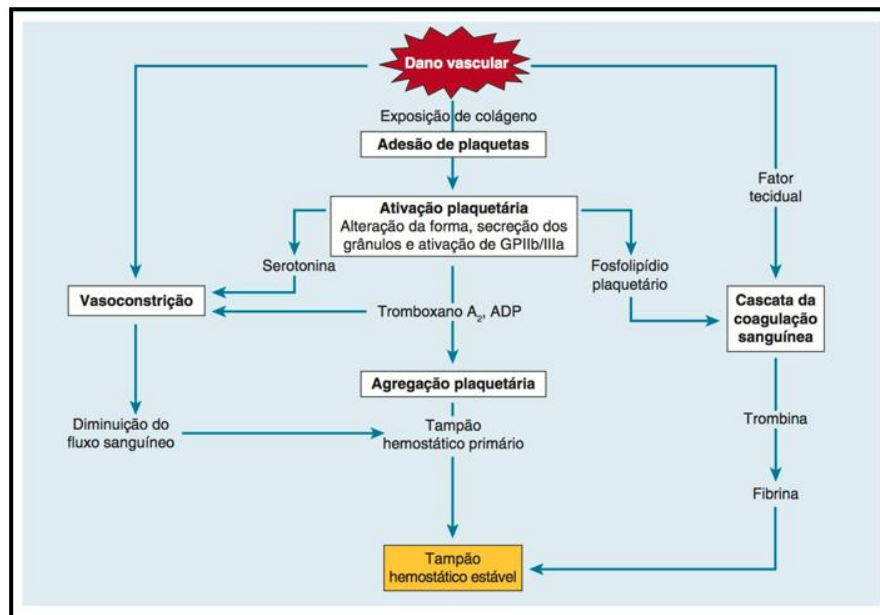


Figura 14: O envolvimento dos vasos sanguíneos, das plaquetas e da coagulação sanguínea na hemóstase.(50)

4.9. Coagulação

A coagulação é essencial para que haja a existência de um sistema circulatório fechado de alta pressão. A resposta a lesões vasculares é necessária para uma hemóstase efetiva. A plaqueta tem como função principal a formação de um tampão mecânico durante a resposta hemostática normal a uma lesão vascular. As suas funções podem ser divididas em reações de adesão, agregação, secreção do conteúdo granular e atividade pro-coagulante, na medida em que induz a ativação da cascata da coagulação. A imobilização das plaquetas no local da lesão requer interações específicas plaqueta-parede vascular (adesão), através do fator de von Willebrand (VWF) e plaqueta-plaqueta (agregação) através do fibrinogénio.

A agregação plaquetária é caracterizada pela ligação cruzada das plaquetas através de recetores ativos de GPIIb/IIIa, utilizando pontes de fibrinogénio. Em estado de repouso, as plaquetas possuem recetores de GPIIb/IIIa que não se ligam ao fibrinogénio, fator de Von Willebrand

(VWF) ou outros ligantes. Quando uma plaqueta é estimulada, ocorre um aumento nas moléculas de GPIIb/IIIa, permitindo a ligação cruzada da plaqueta por meio do VWF e das pontes de fibrinogénio.

A cascata de coagulação é um processo complexo que envolve a ativação sequencial de proteínas precursoras chamadas fatores de coagulação por meio de proteólise. Isto leva à formação de trombina, que por sua vez, converte fibrinogénio em fibrina. A fibrina forma uma malha que estabiliza os tampões plaquetários, resultando na formação de coágulos hemostáticos firmes em locais de lesão vascular. A concentração localizada dos fatores de coagulação é essencial para o funcionamento adequado da cascata. As reações ocorrem em superfícies expostas, como colágeno, fosfolípido plaquetário e fator tecidual. Os fatores de coagulação, exceto o fator XIII, são serina-proteases, e o sistema é altamente amplificado, gerando grandes quantidades de fibrina a partir da ativação de quantidades relativamente pequenas de fatores de coagulação. A cascata da coagulação é composta por 3 vias: a via extrínseca, intrínseca e via comum. (Figura 15)

A via extrínseca da cascata é desencadeada quando o fator tecidual (TF) é exposto pelo endotélio. O fator VIIa liga-se ao fator TF formando o complexo tenase extrínseco, que por sua vez ativa o fator X (início da via comum). O fator Xa juntamente com o cofator V e iões cálcio (Ca^{2+}) formam o complexo de protrombinase, que consiste na formação de trombina a partir da protrombina (fator II) levando à formação de fibrina a partir do fator I designado fibrinogénio. A pequena quantidade inicial de trombina gerada desempenha um papel crucial na amplificação significativa da coagulação. Além disso, a trombina ativa os fatores IX, VIII, V e XI, (via intrínseca e comum) e também cliva o fator von Willebrand (vWF) (via intrínseca), contribuindo amplamente para a formação de VIIa-Xa, conseqüentemente de Xa-Va da via comum.

Relativamente a via intrínseca esta envolve um maior número de passos mais complexos, inicialmente requer os fatores de coagulação VIII, IX, X, XI e XII, juntamente com as proteínas calicreína (PK), cininogénio de alto peso molecular (HWHK), e iões cálcio (Ca^{2+}). A cascata inicia-se quando os fatores XI e XII, proteína calicreína e HWHK entram em contacto com o local da lesão (por exposição às cargas negativas do vaso sanguíneo) ativando assim o fator XIIa. O fator XIIa ativa o fator XI, na presença de cálcio o fator XIa ativa o fator IX, já o facto IX em conjunto com o cofator VIII na presença de cálcio formam o complexo de tenase intrínseco e ativam o fator X pertencente à via comum. O fator Xa juntamente com o fator Va formam protrombina que em seguida é convertida em trombina, conforme anteriormente descrito. A fibrina, em conjunto com plaquetas, forma um coágulo sanguíneo, desempenhando um papel crucial na hemostase e no controlo da hemorragia. ⁽⁵⁰⁾

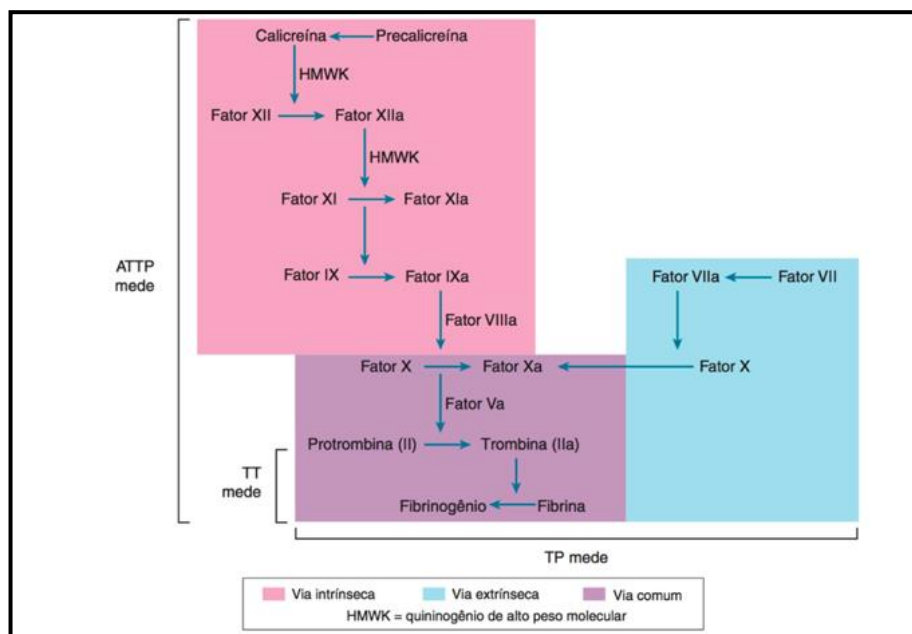


Figura 15: As vias intrínsecas, extrínsecas e comum da coagulação do sangue.⁽⁵⁰⁾

4.9.1. Estudo da Hemóstase

Na secção de hematologia do CHUCB é utilizado o ACL TOP 750 (Instrumentation Laboratory, Werfen) um equipamento que efetua as análises de hemóstase. Este pode realizar medições coagulométricas (turbidimetria), cromogéneas (absorvância) e imunológicas. Os produtos HemosIL da Werfen, oferecem uma ampla variedade de testes de hemóstase líquidos prontos a utilizar, superando outros fabricantes. Com os reagentes HemosIL, um laboratório pode abranger 91% dos testes de hemóstase, incluindo PT, APTT, D-Dímero e antitrombina. Tirando o tempo de reconstituição, aclimatização e pipetagem manual repetitiva dos reagentes consegue-se uma maior eficiência laboratorial e uns cuidados aprimorados aos pacientes em muito pouco tempo. Além disso, os testes HemosIL contribuem para uma melhor gestão de condições como trombocitopenia induzida por heparina, síndrome antifosfolípídica, doença de von Willebrand, trombofilia e outras patologias hemorrágicas e trombóticas. ^(58,59,60)

Tabela 9: Medições coagulométricas.

| | |
|--------------------------|---|
| Medições Coagulométricas | Utilizado para registar o tempo necessário para uma amostra de plasma coagular. Esta técnica avalia o ponto final de coagulação medindo a mudança na densidade ótica. ⁽⁵⁸⁾ |
|--------------------------|---|

| | |
|-----------------------------|--|
| <p>Medições Cromogéneas</p> | <p>Utiliza o princípio colorimétrico para medir a absorvância na cuvete. Um sensor ótico lê a luz (405 nm) que passa pela cuvete. A quantidade de luz absorvida pelo fluido é diretamente relacionada à concentração de paranitroanilina. A luz que atinge o fotodetector é transformada em um sinal elétrico proporcional à atividade da enzima. ⁽⁵⁸⁾</p> |
| <p>Medição Imunológica</p> | <p>Este princípio é utilizado para quantificar diretamente a quantidade de um analito. Nesse método, é avaliada a concentração física do analito (e não a sua atividade) ao medir a alteração na densidade ótica. Ao contrário do método turbidimétrico, o método imunológico baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo para efetuar a transmissão da luz. ⁽⁵⁸⁾</p> |

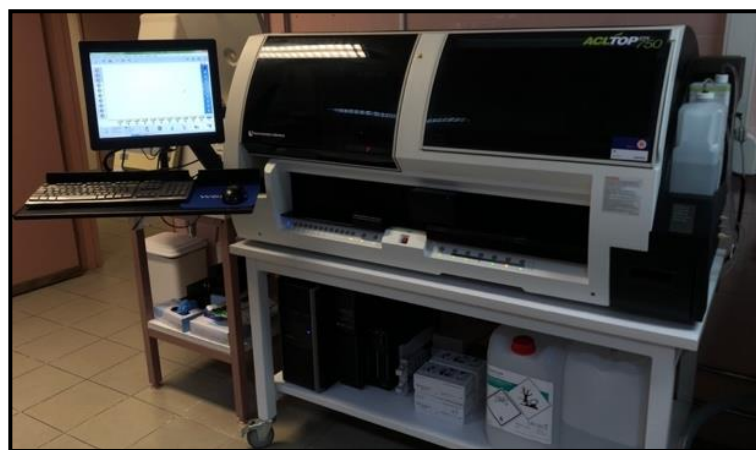


Figura 16: Equipamento ACL TOP 750 (Instrumentation Laboratory, Werfen) laboratório de hematologia.

Para a realização dos estudos da coagulação automatizados é utilizado o plasma colhido a partir de um tubo de citrato de sódio que é centrifugado por 15 minutos a 3500 rpms para que haja a formação de plasma pobre em plaquetas no sobrenadante. No laboratório de hematologia o estudo da coagulação é dividido em coagulação normal e coagulação especial. ⁽⁴⁹⁾

Na análise da coagulação normal, são examinados parâmetros como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), D-dímeros e fibrinogênio. Nos estudos especiais da coagulação, podem ser avaliados parâmetros para investigar a trombofilia (antitrombina, proteína C e proteína S), o anticoagulante lúpico, o fator de Von Willebrand ou a quantificação de qualquer fator específico na cascata de coagulação, conforme solicitado pelo médico. ⁽⁴⁹⁾

Os principais testes diários realizados no laboratório para avaliação da hemóstase são:

Tempo de protrombina (PT) → tempo de coagulação do plasma na presença de tromboplastina, avaliando assim a via extrínseca da cascata de coagulação.

Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) → tempo de coagulação após ativação dos fatores, avaliando assim a via intrínseca.

D-dímeros → avaliação dos produtos resultantes da fibrinólise.

Fibrinogénio → avaliação da conversão de fibrinogénio em fibrina na via comum.

Os testes mais frequentes da hemostasia são então o tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), utilizados para detetar deficiências em fatores de coagulação. Um PT prolongado sugere deficiência do fator VII, enquanto um aPTT prolongado indica deficiência dos fatores da via intrínseca, geralmente hemofilia A ou B (fator VIII ou fator IX) ou deficiência do fator XI. Prolongamentos em ambos PT e aPTT indicam deficiência no fator V, X, II ou anormalidades no fibrinogénio. Um estudo de mistura é usado para determinar se há deficiência de fator ou presença de inibidor.

Outros testes menos comuns também realizados no laboratório incluem a quantificação dos fatores de coagulação e dos inibidores da coagulação. Os inibidores da coagulação incluem a proteína C, a proteína S, a antitrombina e o anticoagulante lúpico (AL). Além disso, é feito um teste para detetar o fator de von Willebrand para diagnosticar a doença de von Willebrand.

(44,49,50)

Tabela 10: Estudo dos distúrbios hemorrágicos. ⁽⁴⁹⁾

| Teste: | Função: | Patologias/alterações associadas: | Valores de referência: |
|---|--|---|------------------------|
| Tempo de protrombina (PT): | Explora a via extrínseca da coagulação; Controlo da terapia anticoagulante oral (TAO). | Deficiências de fatores VII, X, V e II; Insuficiência hepática; Hipovitaminose K; Doença hemorrágica do recém-nascido e prematuridade; Síndromes de má absorção; Presença de inibidores (heparina e terapia anticoagulante oral). | -10 a 15 segundos |
| Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT): | Avalia a via intrínseca da coagulação; Monitorização da terapia anticoagulante com heparina. | Deficiência de fatores XII, XI, X, XI, V, II e fibrinogénio; Doenças hepáticas; Presença de inibidores (heparina); Hipovitaminose K | -24 a 35 segundos |

| | | | |
|---------------|--|--|------------------|
| D-Dímeros: | Deteção dos produtos de degradação da ação da plasmina sobre os coágulos de fibrina. | Situações de Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD); Fibrinólise primária. | |
| Fibrinogénio: | Auxilia na conversão do fibrinogénio em fibrina na cascata da coagulação. | Aumento: Processos inflamatórios; Gravidez. Diminuído: Hipofibrinogenémia; Afibrinogenémia; Disfibrinogenémias; CIVD; Insuficiência hepática grave. | -200 e 400 mg/dL |

Tabela 11: Estudos dos distúrbios trombóticos. ⁽⁴⁹⁾

| Teste: | Função: | Patologias/alterações associadas: | Valores de referência: |
|--------------------|--|--|------------------------|
| Proteína C: | Inibidor fisiológico da coagulação. | Trombose venosa recorrente; Hepatopatias; Terapia anticoagulante oral; CIVD. | -70 a 130% |
| Proteína S: | Cofator da proteína C ativada, aumentando os seus efeitos anticoagulantes e profibrinolíticos. | Insuficiências hepáticas; Síndromes nefróticas; Recém-nascidos; T.A.O.; Doenças tromboembólicas. | -70 a 130% |
| Antitrombina (AT): | Principal inibidor fisiológico da coagulação; essencial para que a terapia anticoagulante com a heparina seja eficiente. | Pacientes com trombofilia; Estados pré-operatórios; CIVD; Síndromes nefróticas; Hepatopatias; Terapia com heparina. | |
| Anti-lúpico (AL): | Interfere com as provas de coagulação em que participam os fosfolípidos, tais como o aPTT. | Indicadores em doentes que tenham um aPTT prolongado sem causa conhecida; Doentes com AL têm maior probabilidade de sofrer manifestações trombóticas e abortos de repetição. | |

| | | | |
|--------------------------------|--|---|--|
| Fator de Von Willebrand (vWF): | Promove a adesão das plaquetas ao endotélio lesado; responsável pelo transporte do fator VIII. | Doença de von Willbrand (doença hemorrágica hereditária autossômica dominante). | |
|--------------------------------|--|---|--|

4.10. Testes de Biologia Molecular

4.10.1. Teste Xpert® HemosIL FII & FV

A trombofilia provoca um aumento do risco de desenvolver coágulos sanguíneos devido a fatores genéticos ou adquiridos. Como tal pode levar à formação de coágulos nas veias ou artérias, resultando em condições como trombose venosa profunda ou embolia pulmonar. Os primeiros testes laboratoriais para trombofilia focavam maioritariamente nas deficiências de antitrombina, proteína C e proteína S. No entanto, descobertas recentes mostram que o tromboembolismo venoso é uma condição complexa influenciada por fatores genéticos e adquiridos, incluindo mutações específicas como é o caso das mutações de Leiden do FII e FV, que desempenham um papel significativo em combinação com fatores como a idade.

O Xpert® FII & FV (Cepheid®) é um teste *in vitro* baseado na genotipagem que identifica qualitativamente a presença de variantes genéticas específicas nos genes do fator II (FII) e fator V (FV). Efetuado no sistema Cepheid® GeneXpert, o objetivo deste teste é oferecer resultados rápidos sobre as mutações específicas (G20210G>A) no FII e (G1691G>A) no FV em sangue total anticoagulado com citrato de sódio ou em EDTA. Este teste rápido auxilia no diagnóstico de casos suspeitos de trombofilia. ^(61,62)

4.10.2. Teste Xpert® BCR-ABL Ultra

A Leucemia Mieloide Crónica (LMC) é diagnosticada em cada 1,0-1,5 novos pacientes a cada 100.000 pessoas, estima-se que duplique o número de casos até 2030. A LMC é caracterizada pela presença de uma alteração genética específica conhecida como cromossomo Philadelphia, resultante de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22. Essa translocação gera um gene híbrido chamado BCR-ABL, que produz uma proteína anormal chamada proteína de fusão BCR-ABL. Esta proteína tem atividade tirosina quinase descontrolada, levando assim ao crescimento descontrolado das células mieloides, o que é característico da leucemia.

O tratamento principal envolve inibidores da tirosina quinase, administrados oralmente. A avaliação da eficácia do tratamento requer testes moleculares para medir o transcrito BCR-ABL (RNA) a cada 3 meses.

O Xpert® BCR-ABL Ultra (Cepheid®) é um teste quantitativo que analisa os transcritos mRNA de BCR-ABL (p210) associados à Leucemia Mieloide Crónica em sangue periférico. Por meios do equipamento presente no laboratório o Cepheid® GeneXpert, o teste automatiza todo o

processo desde o isolamento do RNA até a PCR em tempo real dos genes BCR-ABL e de referência ABL. Este teste fornece resultados moleculares altamente sensíveis de forma rápida e sob demanda do dia a dia. ^(63,64)

4.11. Citometria de fluxo

A introdução de anticorpos monoclonais revolucionou a classificação das doenças hematológicas, identificando mais de 200 marcadores fenotípicos de células hematopoéticas, conhecidos como "conjunto de diferenciação ou *cluster differentiation*" (CD). Estes marcadores são detetados por anticorpos monoclonais em técnicas como imunocitoquímica e imunofluorescência.

Na imunocitoquímica, os anticorpos monoclonais são conjugados com enzimas, revelando a reação antígeno-anticorpo por compostos coloridos permitindo uma avaliação imunofenotípica e morfológica.

Na imunofluorescência, os anticorpos monoclonais são conjugados a fluorocromos, gerando luminescência colorida quando excitados por um feixe de laser. Esta técnica pode ser aplicada *in situ* em lâminas fixadas ou em células em suspensão, como na citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é a técnica preferida para a imunofenotipagem de doenças hematológicas malignas. Um citômetro de fluxo possui três componentes principais: um sistema que controla o fluxo de células ou partículas, um sistema ótico que utiliza lasers, filtros e detetores para capturar sinais de fluorescência, e um sistema eletrônico integrado ao software para aquisição e análise de dados. ⁽⁶⁵⁾

O citômetro de fluxo mede várias propriedades das células suspensas em um meio líquido em movimento. Quando uma partícula passa por um feixe de laser ela gera um padrão luminoso característico, que é medido pelos detetores de luz. Essa técnica é usada para contar e classificar células, partículas virais, fragmentos de DNA e bactérias. ⁽²⁾

As amostras mais usadas são aspirados de medula óssea e sangue periférico, sendo necessária a lise das hemácias e a separação das células por densidade. O citômetro de fluxo é utilizado para pesquisa de antígenos intracelulares, com tratamento permeabilizador da membrana celular antes da incubação com os anticorpos monoclonais. Os resultados são representados por histogramas e gráficos, expondo tamanho, granulosidade e populações celulares como linfócitos, monócitos, granulócitos, células plasmáticas e células imaturas.

No setor de hematologia do CHUCB é utilizado o BD FACSCalibur™ Flow Cytometer, este equipamento é o primeiro sistema a fornecer capacidades padrão de análises multicoloridas com o uso de tecnologia de laser duplo, compensação interfeixe, e um design ótico sem necessidade de alinhamento, o sistema BD FACSCalibur™ assegura alta sensibilidade, compensação mínima e máxima flexibilidade na escolha de fluorocromos. ^(44,66)

5. Laboratório de Imunoquímica

O laboratório de imunoquímica do SPC é dividido em duas áreas principais: bioquímica e imunologia. O objetivo principal deste laboratório é identificar e compreender alterações no sistema imunológico e também nos níveis bioquímicos do corpo humano. Tal informação ajuda no diagnóstico e compreensão de uma ampla gama de condições de saúde relacionadas à imunidade e processos químicos no organismo.

5.1. Procedimento Analítico

O procedimento analítico no laboratório de análises clínicas é composto por três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica, sendo este procedimento transversal a todas as análises clínicas. No laboratório de imunoquímica do SPC da ULS CHUCB, esta presente o equipamento específico que realiza esse processo. Por esse motivo o assunto é abordado nesta seção do relatório.

5.1.1. Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica é uma etapa crítica que requer muita atenção porque é onde ocorrem a maioria dos erros humanos, esta fase começa quando o médico solicita os exames, inclui a preparação do paciente e a colheita da amostra, bem como o transporte da mesma e a preparação para as respectivas análises (como centrifugação, alíquotagem e distribuição para os diferentes setores). Esta fase termina quando o processo analítico realmente começa.

Na seção de imunoquímica o serviço de patologia clínica tem um equipamento capaz de realizar a fase pré-analítica automaticamente, com o propósito de minimizar os erros e aumentar a velocidade de processamento das amostras dentro do serviço.

O equipamento é o Cobas® p612 pre-analytical system (Figura 17), este reconhece as amostras através de um leitor de código de barras no tubo e pela cor da tampa do mesmo, além disso é capaz de verificar os níveis de líquido nos tubos e analisar características da amostra, como a presença de icterícia, lipemia e hemólise. O objetivo principal é a maximização do “*flow*” de trabalho e a otimização do mesmo, prevenido assim o gasto de possíveis reagentes e a subcarga no trabalho laboratorial. O equipamento está programado para distribuir as amostras para diferentes suportes (racks) de acordo com os testes que precisam de ser realizados. Este sistema pré-analítico também possui a capacidade de efetuar alíquotagem garantido assim o uso eficiente das amostras.

Após a conclusão de todos os testes, as amostras são armazenadas e recebem uma posição específica para possibilitar o rastreamento, caso necessário, torna-se possível efetuar o rastreamento pois o Cobas® p612 esta associado a um programa chamado Cobas® Infinity, uma solução de *middleware* avançado projetado para trabalhar com os analisadores e sistemas de automação da família Cobas®. Os arquivos são armazenados numa câmara frigorífica por

sete dias. No entanto, há tubos que precisam de ser manipulados e distribuídos manualmente como os tubos pediátricos e os tubos de urina para análise de sedimentos. Estas exceções ocorrem porque o Cobas p612 está configurado para aceitar apenas certos tamanhos de tubos e não outros. ^(67,68,69)



Figura 17: Cobas® p612 laboratório de imunoquímica.

5.1.2. Fase Analítica

O processo das análises inicia-se com a verificação e manutenção dos equipamentos utilizados, conseqüentemente procede-se à preparação dos reagentes, calibração e à verificação dos controlos. Nesta fase, também são aplicados os critérios de validação dos resultados e a verificação da qualidade das amostras. Os calibradores e controlos desempenham um papel primordial neste processo analítico pois são essenciais para calibrar as técnicas nos diferentes equipamentos e garantir a precisão e exatidão dos resultados. ⁽⁶⁷⁾

Tabela 12: O que são calibradores e controlos.

| | |
|---------------|---|
| Calibradores: | São amostras de concentração conhecida de um analito específico. Destinam-se a calibração de equipamentos/ técnicas de análises e garantir a precisão dos resultados laboratoriais. |
| Controlos: | Uma amostra especialmente preparada para ser utilizada nos métodos de análise, com o objetivo de avaliar a precisão e a exatidão dos resultados. |

Em resumo, os calibradores são usados para calibrar o equipamento de análise, enquanto os controlos são utilizados para monitorizar a precisão dos resultados dos testes laboratoriais, sendo ambos essenciais para garantir a qualidade e confiança dos dados produzidos pelo laboratório.

Para tal, o controlo de qualidade interno (CQI) é feito todos os dias, antes de realizar o processamento de qualquer amostra de doentes permitindo assim uma validação da qualidade diariamente. Cada um dos controlos ira ter uma média e desvio padrão específico sendo que alguns deles como são controlos multiparamétricos o mesmo pode ser usado para mais do que um parâmetro. Estes valores dos controlos são comparados com os valores descritos pela casa comercial. No que toca ao contro de qualidade externo (CQE), a amostra é tratada da mesma forma que fosse um doente enviando depois os resultados obtidos para as instituições responsáveis. Fazem parte destas instituições a Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratórios (SEQC), United Kingdom National External Quality Assessment (NEQAS) e Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge (INSA). ⁽⁶⁷⁾

5.1.3. Fase Pós-Analítica

A fase pós-analítica torna-se uma das mais importantes em todo o processo, pois é aqui que se insere a validação biopatológica e a disponibilização dos resultados obtidos. Esta validação é feita pelos médicos/ farmacêuticos patologistas do SPC. A validação tem em conta os resultados obtidos no histórico clínico do paciente, o seu tratamento e o seu diagnóstico. ⁽⁶⁷⁾

5.2. Química Analítica

5.2.1. Cobas® Serie 8000

O Cobas® Serie 8000 é uma linha de sistemas de automação de laboratório fabricada pela Roche Diagnostics. No laboratório de imunoquímica do CHUCB o analisador modular automático é composto pelos seguintes módulos: modulo ISE, modulo de química c502 e dois módulos de imunologia e602. (Figura 2) Este sistema é projetado para oferecer eficiência, precisão e flexibilidade nos laboratórios de diagnóstico clínico de médio a alto volume. ^(70,71)



Figura 18: Cobas® Serie 8000 laboratório de imunquímica

(Unidade Core/Módulo ISE/Módulo c502/ dois Módulos e602)

5.2.1.1. Cobas® Série 8000: Módulo ISE

Este módulo utiliza três elétrodos seletivos de íões e um elétrodo de referência para medir a concentração de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-) em amostras diluídas pela técnica de potenciometria indireta. Trata-se de uma técnica em que a concentração de um íão específico é determinada através da medição da diferença de potencial elétrico gerada quando o íão atravessa uma membrana seletiva em um elétrodo. Essa diferença de potencial, ou força eletromotriz, é determinada pelo elétrodo e utilizada para calcular a concentração do íão em estudo. ^(72,73)

Amostras como soro e urina são analisadas neste módulo do Cobas®.

5.2.1.2. Cobas® Série 8000: Módulo c502

Este módulo utiliza dois tipos de ensaios: o ensaio fotométrico e o ensaio imunoturbidimétrico.

No ensaio fotométrico a amostra é exposta a uma fonte de luz com comprimento de onda específico um fotômetro mede a quantidade de luz que é absorvida pela amostra, quanto maior a concentração do analito na amostra maior será a absorção da luz e menor será a intensidade da luz transmitida através da amostra. A prova em análise é misturada com um reagente específico numa cuvete de reação, estes são misturados usando um agitador ultrassônico integrado no equipamento. Neste método, a reação entre a amostra e o reagente produz uma cor cuja sua intensidade corresponde à concentração do analito. Após a mistura a luz atravessa a cuvete de reação e é dividida em diferentes comprimentos de onda por uma grelha de difração estes diferentes comprimentos de onda são refletidos para 12 fotodíodos diferentes no fotômetro. Cada fotodíodo vai detectar um comprimento de onda específico permitindo assim calcular as concentrações dos analitos. A concentração do analito é proporcional à intensidade da cor gerada.

No ensaio imunoturbidimétrico, uma técnica imunométrica que utiliza a imunoprecipitação e a dispersão da luz para quantificar a quantidade de analito presente no soro como complexo antígeno x anticorpo ou proteínas de grandes dimensões. Com a utilização de partículas de latex revestidas com anticorpos monoclonais contra a molécula em estudo (imunoprecipitados) leva a diminuição da intensidade do feixe de luz incidente que atravessa a solução. A presença dos complexos leva a turvação. (imunoturbidimetria). ^(74,75)

Amostras como soro, urina e líquidos biológicos podem ser analisados neste módulo do Cobas®.

Tabela 13: Parâmetros analisados no módulo c502.

| | |
|-----------------------------|--|
| Método fotométrico: | Ácido úrico, Amicacina, α -Amílase, Aspartato Aminotransferase, Alanina Aminotransferase, Bilirrubina Direta, Bilirrubina Total, Cálcio, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Colesterol Total Creatina Cinase, Creatinina, Ferro, Fosfatase Alcalina, Fósforo, γ -Glutamilttransferase, Magnésio, Proteínas Totais, Triglicéridos e Ureia. |
| Método imunoturbidimétrico: | Alfa-1-Antitripsina, Cadeias leves livres (Kappa e Lambda), Beta-2-microglobina, C3 e C4, Enzima de Conversão de Angiotensina, Haptoglobina, IgA, IgG, IgM, Lipoproteína A, Proteína C Reativa, Transferrina e Recetor Solúvel da Transferrina. |

5.2.1.3. Cobas® Série 8000: Módulo e602

Este módulo utiliza a técnica de electroquimioluminescência para a determinação de parâmetros imunológicos.

A eletroquimioluminescência é um método indireto de quantificação que utiliza reações entre espécies altamente reativas para gerar luz quando uma corrente elétrica é aplicada. Nesta técnica, são empregues dois anticorpos monoclonais marcados com ruténio e outro com biotina que se vão ligar ao antígeno alvo na amostra formando um complexo sandwich (técnica sandwich). Este complexo é então ligado a micropartículas revestidas com estreptavidina visto que esta tem uma grande afinidade para com a biotina que faz com que estes complexos se liguem à fase sólida destas micropartículas. Após a aspiração para uma célula de leitura, as micropartículas são fixadas magneticamente a um eléctrodo a aplicação de uma corrente elétrica resulta na emissão de luz quimioluminescente medida por um fotomultiplicador. A concentração de analito é diretamente proporcional à intensidade de luz detetada: quanto mais luz, maior a concentração do analito. ^(76,77)

Amostras como soro, urina e líquidos biológicos podem ser analisados neste módulo do Cobas®.

Tabela 14: Parâmetros analisados no módulo e602.

| | |
|--------------------------------------|--|
| Método de eletroquimioluminescência: | Ferritina, Antígeno Específico da Próstata (total e livre), TSH, T3 Livre e T4 Livre, Folatos, Vitamina D e B12, Paratormona (PTH), CA 19.9, CA 15.3, CEA, AcHCV, AcHIV, AcHBS, AgHBS, AcHBc, Treponema Pallidum (Sífilis), Rubéola (IgM e IgG), Toxoplasmose (IgM e IgG) e ainda Citomegalovírus (IgM e IgG). |
|--------------------------------------|--|

5.2.2. Cobas® e 411

O equipamento Cobas® e411 é um analisador automatizado muito parecido com o módulo e602 do Cobas® Série 8000 como anteriormente explicado. Utiliza a mesma metodologia de eletroquimioluminescência para a determinação de diversos parâmetros. Este equipamento encontra-se no laboratório de imunoquímica com a função de backup caso o módulo e602 tenha algum tipo de avaria, é também utilizado para fazer outro tipo de testes com o objetivo de rentabilizar as amostras e o desempenho do laboratório. Uma das grandes diferenças é a rapidez do equipamento no tratamento das amostras, efetuando assim 80 testes/h comparativamente ao módulo e602 que tem uma velocidade de processamento de 340 testes/h. ^(78,79)

Amostras como soro e urina são analisadas neste equipamento.

Tabela 15: Parâmetros analisados no Cobas® e411.

| | |
|---|---|
| Método de eletroquimioluminescência: (Para além dos analisados no módulo e602 referidos na tabela 3) | Tiroglobulina, Hormona Anti-Mulleriana (AMH), CA 125, Testes de Aidez (AVCMV), HBeAc, HBeAg e Insulina. |
|---|---|



Figura 19: Cobas® e 411 laboratório de imunoquímica.

5.2.3. Abbott Architect i2000SR

O equipamento Architect i2000SR (Abbot) presente no laboratório de imunquímica é um analisador de imunoenaios que tem a capacidade máxima de realizar até 200 testes/h, este pode carregar até 135 amostras de soro ou urina, das quais 35 são de alta prioridade (urgente) e 100 são de rotina. Além destas, possui 25 posições para armazenamento de reagentes refrigerados. O método de quantificação utilizado por este equipamento é a técnica de quimioluminescência. Esta técnica envolve a emissão de luz quando um eletrão se move de um estado energético superior (estado excitado) para um estado energético inferior, todo este processo ocorre em quatro etapas: primeiro o analito é combinado e incubado com micropartículas revestidas com anticorpos específicos, de seguida ocorre uma lavagem para remover compostos que não estejam ligados às micropartículas. No terceiro passo, são adicionados anticorpos marcados com um agente luminescente, acridina, que se ligam ao analito. Na etapa final, soluções pré-ativadoras (H_2O_2) e ativadoras (NaOH) são adicionadas resultando na emissão de quimioluminescência que é medida em unidades de luz relativas (RLU).

Quanto maior a concentração do analito, maior será a luz gerada, refletindo uma relação direta entre a concentração do analito e as RLU detetadas pelo sistema ótico do equipamento. ^(80,81)

Amostras como soro e urinas são analisadas neste equipamento.

Tabela 16: Parâmetros analisados no Abbot Architect i2000SR.

| | |
|--------------------------------|---|
| Método de quimioluminescência: | Marcadores Cardíacos (Homocisteína, Creatinina Quinase MB, Pró-BNP, entre outros), Hormonas da Fertilidade (LH, FSH, Prolactina, Progesterona, Estradiol, Testosterona, Estrogénio e SHBG), Hepatites (A, B e C), Vírus (Epstein-Barr e HLTV tipo I e II), Proteínas Tiroideias (Anti-Tiroglobulina e Anti- Peroxidase Tiroideia) e Cortisol. |
|--------------------------------|---|



Figura 20: Abbott Architect i2000SR laboratório de imunquímica.

5.2.4. Atellica® NEPH 630 System

O equipamento Atellica® NEPH 630 System (Siemens Healthineers) existente no laboratório de imunoquímica do SPC este é responsável pela determinação da concentração de cadeias livres em amostras de soro pela técnica de imunonefelometria. Esta técnica é utilizada para medir a concentração de substâncias específicas no soro comumente usada para quantificar proteínas, imunoglobulinas e outros biomarcadores importantes. A técnica é baseada na detecção da luz dispersa por partículas suspensas num líquido quando são expostas a um feixe de luz.

Na imunonefelometria, ocorre uma reação entre as proteínas da amostra e anticorpos específicos havendo a formação de imunocomplexos que turvam o meio um detetor mede a luz dispersa num ângulo de 90 graus em relação ao feixe de luz incidente. A intensidade da luz dispersa é diretamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra, e conseqüentemente ao analito em estudo. Portanto, quanto mais intensa a luz dispersa, maior a concentração do analito. ^(82,83)

Este equipamento pode analisar amostras de soro, urina e outros líquidos biológicos, mas principalmente são analisadas amostras de soro.

Tabela 17: Parâmetros analisados no Atellica® NEPH 630 System.

| | |
|------------------------------|---|
| Método de imunonefelometria: | Fator Reumatoide, Beta-2-Microglobulina (β_2M), Cadeias Livres Livres Kappa, Cadeias Livres Livres Lambda, Cistatina C, Apolipoproteína A, Apolipoproteína B e Antiestreptolisina (TASO). |
|------------------------------|---|

5.3. Testes Imunológicos

5.3.1. ImmunoCAP™ 250

É fundamental realizar testes *in vitro* confiáveis para identificar anticorpos IgE específicos pois as doenças alérgicas estão a tornar-se um problema de saúde cada vez mais prevalente nos dias de hoje. Estes testes ajudam os médicos a diagnosticar ou descartar alergias, prescrever e acompanhar tratamentos prevenindo o surgimento de doenças associadas.

No laboratório de imunoquímica do SPC existe um equipamento o ImmunoCAP™ 250 (ThermoFisher Scientific) que é utilizado para o diagnóstico de alergias a diferentes substâncias tais como: alimentos, gramíneas, árvores, ervas infestantes, epitélios e proteínas animais, ácaros, pó de casa, insetos e muitos mais, é também utilizado para o estudo de parâmetros relacionados a doenças inflamatórias intestinais (calprotectina). É um equipamento altamente sensível e confiável, oferece resultados precisos que ajudam os médicos a tomar decisões clínicas.

Os métodos de quantificação utilizados por este equipamento são ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) no caso de se pretenda quantificar os alérgenos, caso se queira a quantificação da calprotectina utiliza-se o método EIA (ensaio imunoenzimático).

O ImmunoCAP utiliza a técnica ELISA em um imunoenensaio sandwich (reação antígeno-anticorpo) para medir a presença de anticorpos IgE específicos no soro do paciente, o alérgeno é ligado ao ImmunoCAP (fase sólida) e reage com as IgE presentes na amostra. Na próxima fase, são adicionados anticorpos marcados com uma enzima anti-IgE humana, formando um complexo, quanto maior a resposta maior a presença de IgE na amostra. Este teste permite entender a sensibilidade do paciente a um alérgeno específico, identificando uma possível alergia mesmo antes dos sintomas já que as IgE específicas podem estar presentes após um primeiro contato com o alérgeno mesmo sem uma reação alérgica imediata.

O ensaio imunoenzimático (EIA) é utilizado para quantificar a calprotectina como anteriormente referido. Anticorpos monoclonais anti-calprotectina são usados para revestir a fase sólida, se a calprotectina estiver presente na amostra ocorre então ligação. Na próxima fase, são adicionados anticorpos anti-calprotectina marcados com uma enzima que vão formar um complexo calprotectina-conjugado. Após a incubação com uma solução de desenvolvimento, a reação é interrompida e a fluorescência emitida é então lida por um detetor.

A concentração de calprotectina é diretamente proporcional à intensidade da fluorescência. A calprotectina precisa ser extraída das fezes do paciente usando um kit de extração presente no laboratório de microbiologia. (84,85,86)



Figura 21: ImmunoCAP™ 250 laboratório de imunoquímica.

5.3.2. Eletroforese de Proteínas Séricas

No laboratório de imunquímica do SPC utiliza-se a técnica de eletroforese capilar por meios do equipamento automatizado o CAPILLARYS 3 Octa (Sebia). A eletroforese capilar é uma técnica analítica que utiliza um capilar para separar moléculas com base nas suas cargas e diferentes tamanhos, trata-se de uma técnica altamente sensível e rápida, frequentemente utilizada em laboratórios para análises quantitativas e qualitativas de uma variedade de amostras biológicas. Neste equipamento também é possível efetuar uma imunosubtração permitindo caracterizar o componente monoclonal. O HYRYSIS Focusing (Sebia) é outro equipamento disponível no laboratório que é utilizado para a caracterização de proteínas, por meio de imunofixações séricas. Este oferece uma abordagem alternativa à eletroforese capilar do CAPILLARYS 3 Octa (Sebia), permitindo a identificação e quantificação de proteínas através de técnicas específicas de imunofixação. ⁽⁶⁷⁾

5.3.2.1. CAPILLARYS 3 Octa (Sebia)

Este equipamento permite realizar eletroforeses capilares de proteínas séricas.

Na eletroforese capilar (EC), as moléculas carregadas eletricamente são separadas com base na sua mobilidade eletroforética a um nível de pH específico e em um tampão alcalino, a separação ocorre de acordo com o pH do eletrólito e do fluxo eletrosmótico. A EC possui um fluxo constante, este fluxo resulta em picos mais estreitos e maior resolução na EC.

A EC envolve a introdução da amostra num capilar com as extremidades em recipientes que contem um tampão com um elétrodo, um potencial elétrico é aplicado por alguns segundos, fazendo com que os analitos se movam em direção ao detetor dependendo das suas cargas respectivas. O proteinograma resultante é crucial para diagnosticar gamapatias monoclonais e outras doenças, como patologias renais ou hepáticas.

As proteínas séricas são separadas em seis frações: Albumina, Alfa-globulina (alfa 1 e alfa 2), Beta-globulina (beta 1 e beta 2) e gamaglobulina. O diagnóstico é baseado nas alterações observadas em cada fração/picos. Esta análise deve ser feita apenas em soro para evitar interferências, como o fibrinogênio (proteínas de coagulação). ^(87,88,89)



Figura 22: CAPILLARYS 3 Octa (Sebia) laboratório de imunquímica.

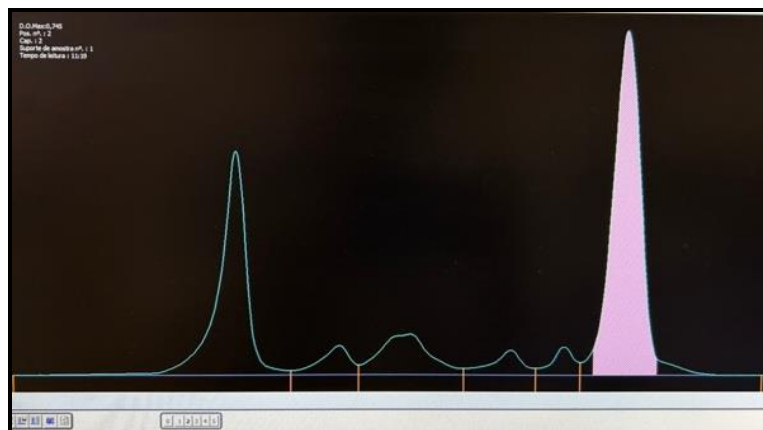


Figura 23: Proteinograma de um doente com um mieloma múltiplo (Albumina 29,4%<, Alfa-globulina (alfa-1 a 4,3% e alfa-2 a 10,2%), Beta- globulina (beta-1 a 3,9%< e beta-2 a 3,2%) e Gama- globulina a 49%>)

5.3.2.2. HYDRASIS Focusing (Sebia)

A eletroforese em gel é utilizada no rastreio de proteínas no soro, na urina e em outros fluidos biológicos para o diagnóstico.

- Imunofixação sérica:

É uma técnica que separa as proteínas com base nas suas cargas elétricas, antissoros específicos (imunoglobulinas anti-humanas) são então aplicados para se ligarem às proteínas correspondentes. Após isso, o gel é corado com violeta de cristal para revelar a presença ou ausência das proteínas.

- Imunofixação urinária:

A técnica é similar à imunofixação sérica, mas utiliza dois tipos diferentes de géis: Gel de Perfil Urinário e Gel de Bence-Jones. A escolha do gel depende do nível de proteínas na urina; se for superior a 150 mg/24h, utiliza-se o gel de perfil urinário, caso contrário, usa-se o gel de Bence-Jones.

A técnica de imunofixação em Gel de Perfil Urinário é aplicada para analisar o perfil de proteínas na urina (proteinúria), esta técnica é útil para identificar a presença de várias proteínas incluindo a proteína de Bence-Jones, bem como proteínas glomerulares e tubulares.

A imunofixação do gel Bence-Jones é utilizada para identificar cadeias leves livres na urina, as quais aparecem em grandes concentrações quando o organismo não consegue metabolizá-las, estas cadeias leves são parte das imunoglobulinas e são sintetizadas em maior quantidade do que as cadeias pesadas nos plasmócitos, resultando em um excesso de cadeias leves livres no sangue. Um aumento significativo dessas cadeias leves livres indica uma alteração na produção de imunoglobulinas e está associado a um mau prognóstico, característico de mieloma múltiplo.

Os antissoros utilizados são direcionados especificamente para as seguintes componentes: cadeias pesadas G, A e M (antissoro trivalente), bem como para as cadeias leves Kappa e Lambda, além das cadeias leves livres Kappa e Lambda.

Enquanto na imunofixação sérica são usadas amostras de soro, na imunofixação urinária é possível utilizar amostras de urina 24 horas, além de também ser possível usar amostras de soro. (90,91)



Figura 24: HYDRASIS Focusing (Sebia) laboratório de imunquímica.

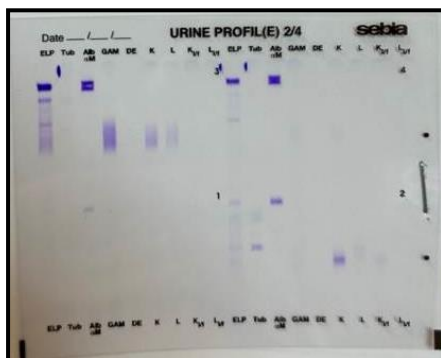


Figura 25: Gel de Perfil Urinário

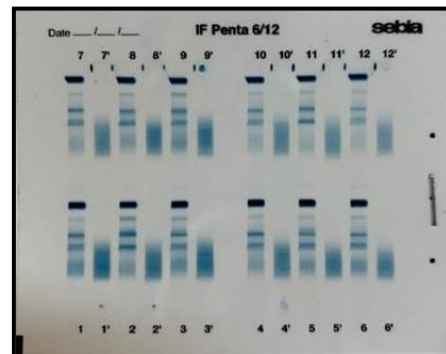


Figura 26: Gel de Imunofixação Sérica.

5.4. Testes Rápidos

5.4.1. Pesquisa de Drogas de Abuso

O teste SureStep™ Urine Drug Test Dip é um teste rápido de imunoenensaio cromatográfico de fluxo lateral fabricado pela Abbott. O cartão de teste permite a detecção qualitativa de diferentes drogas em amostras de urina, após 5 minutos o resultado pode ser facilmente lido. As drogas presentes no kit são: anfetaminas, benzodiazepinas, cannabis, cocaína e morfina.

Visto que se trata de um teste imunocromatográfico na ausência de drogas na urina, uma linha colorida aparece na região do teste, indicando um resultado negativo. Caso haja a presença de drogas, os locais de ligação ao anticorpo ficaram saturados logo resulta na ausência de uma linha colorida na região do teste, indicando assim um resultado positivo. ^(67,92,93)

5.4.2. Teste de Gravidez

O teste de urina Wondfo One Step hCG é um teste rápido para a detecção qualitativa da gonadotrofina coriônica humana (hCG) na urina. Este teste detecta a presença de hCG numa concentração de 10 mIU/mL ou superior. A hCG é um marcador de gravidez, que aparece na urina muito cedo durante a gravidez, pois trata-se de uma das glicoproteínas secretadas pela placenta. Contém subunidades alfa e beta, a subunidade alfa do hCG apresenta reações cruzadas com LH, TSH e FSH, devido as semelhanças nas sequências de aminoácidos, no entanto a subunidade beta é específica e mostra reações cruzadas mais baixas.

O teste Wondfo One Step hCG tem como objetivo ser um teste específico de hCG utilizando um anticorpo monoclonal contra beta-hCG altamente purificado. O kit baseia-se no princípio do imunoensaio em sanduiche de anticorpos duplos para determinação de hCG na urina. Quando a urina é adicionada ao poço da amostra, esta é absorvida pelo dispositivo por ação capilar mistura-se com o conjugado de anticorpo monoclonal beta-hCG que flui através da membrana pré-revestida. Quando o complexo se forma, resulta uma linha cor-de-rosa, indicando um resultado positivo, se não houver hCG presente na amostra o conjugado não se forma, e consequentemente, não será visível nenhuma linha colorida na área do teste. ^(67,94,95)

6. Conclusão

O estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB) revelou ser uma experiência enriquecedora e fundamental para a minha formação académica e profissional. Durante os nove meses de estágio (1200 horas), que foram distribuídos igualmente pelos laboratórios de microbiologia, hematologia e imunoquímica, tive a oportunidade de aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do mestrado em bioquímica, bem como adquirir novas competências práticas e profissionais na área da saúde.

Ao longo deste percurso nem sempre foi fácil acompanhar a rotina do laboratório. No entanto, julgo fundamental realizar um estágio numa área como esta, onde a prática é essencial. Um dos aspetos mais marcantes do meu estágio foi o deparar-me com a elevada automatização dos laboratórios. A integração da tecnologia avançada permitiu não apenas otimizar o fluxo de trabalho, mas também garantir a precisão e a rapidez da entrega dos resultados aos clínicos. Sendo esta automação crucial para a eficiência e a qualidade do serviço prestado aos pacientes, refletindo-se diretamente na capacidade de resposta do hospital. Outro ponto a destacar foi a excelente disposição e o espírito de colaboração de todos os funcionários do SPC. A atitude positiva e disponibilidade para partilhar conhecimentos foram fundamentais para um ambiente de trabalho produtivo e motivador. Esta experiência demonstrou a importância do trabalho em equipa e da comunicação eficaz no contexto laboratorial.

Para concluindo, este estágio foi uma etapa decisiva na minha formação, tal como eu pretendia, proporcionando-me assim uma visão aprofundada e prática das rotinas laboratoriais em patologia clínica, e dos desafios ultrapassados no dia-a-dia nesta área. As competências adquiridas e as experiências vividas vão contribuir significativamente para o meu desenvolvimento profissional e académico, preparando-me para futuros desafios na área da bioquímica.

Capítulo 2: Projeto de Investigação

1. Introdução

De acordo com o GLOBOCAN 2020, os números de novos casos de cancro diagnosticados em 2020 foram de 19,3 milhões, e quase 10,0 milhões de indivíduos morreram devido ao cancro. O GLOBOCAN prevê que o número de casos de cancro aumente para 28,4 milhões em 2040. O cancro colorretal (CCR) ocupa o terceiro lugar entre os tipos de cancro mais diagnosticados globalmente e o segundo em termos de número de mortes. ⁽⁹⁶⁾ O CCR é uma das principais causas de morte por cancro em Portugal. A cada ano, aproximadamente 7.000 novos casos são diagnosticados, resultando numa média diária de 11 mortes devido a esta doença. ⁽⁹⁷⁾

Na atualidade, os padrões de vida global e o acesso à saúde melhoraram, resultando em avanços significativos no diagnóstico e tratamento de doenças, elevando a esperança média de vida em muitas regiões. No entanto, apesar da diminuição das mortes por doenças infecciosas, as taxas de mortalidade relacionadas ao cancro aumentaram cerca de 40% nos últimos 40 anos, com previsão de um aumento adicional de 60% nos próximos 15 anos. As principais causas de mortalidade relacionadas ao cancro também mudaram, estando relacionadas ao envelhecimento da população e a fatores como má alimentação, tabagismo, sedentarismo e obesidade. O cancro colorretal, antes raro, tornou-se prevalente, representando agora cerca de 10% das mortes por cancro. Além disso, as mudanças na incidência do cancro também são observadas em síndromes familiares, como a síndrome de Lynch, que agora é responsável principalmente por 3% do cancro colorretal em vez de cancro gástrico, devido à diminuição da infeção por *Helicobacter pylori*. ⁽⁹⁸⁾

Novos tratamentos para o CCR foram desenvolvidos, como cirurgia laparoscópica para a doença primária, ressecção de metástases, radioterapia e quimioterapia para um estado mais avançado. Apesar destes avanços, as taxas de cura e sobrevivência a longo prazo permanecem estáveis. Os programas de rastreamento para deteção antecipada ganharam muita importância, prevendo-se que venham a ter um impacto significativo nas próximas décadas. Investigações em métodos de rastreamento não invasivos, como testes imunoquímicos fecais e de DNA fecal, estão em curso. A qualidade da colonoscopia de rastreamento também melhorou substancialmente. ⁽⁹⁸⁾

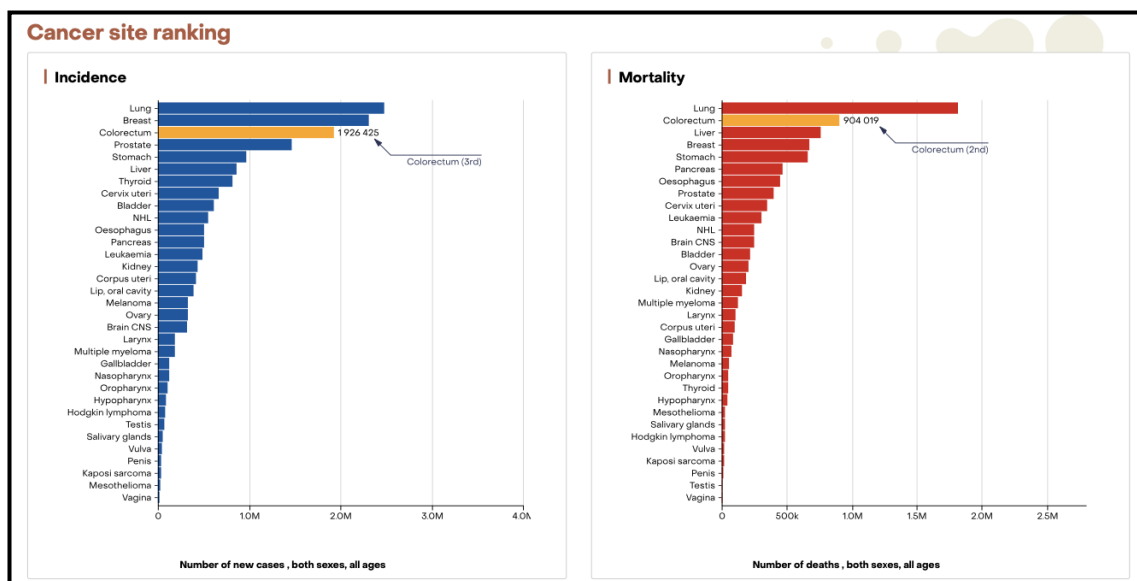


Imagem 27: Gráficos estatísticos “Cancer today”. Disponível em Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/41-colorectum-fact-sheet.pdf>)

1.1. Cancro Colorretal

O cancro colorretal tende a desenvolver-se gradualmente, muitas vezes sem apresentar sintomas até alcançar um tamanho considerável, geralmente de vários centímetros. No estado mais avançado, pode causar obstrução das fezes no intestino resultando em cólicas, dor ou sangramento, que pode ser manifestado como sangue visível durante as evacuações ou, em casos mais raros, fezes com uma aparência escura. ⁽⁹⁹⁾ Pode também ocorrer anemia e várias outras complicações. ⁽¹⁰⁰⁾ O cólon e o reto são partes do sistema digestivo, formando um longo tubo muscular conhecido como intestino grosso. O cólon é a primeira parte do intestino grosso, enquanto o reto é a última. O tumor que começa no cólon é chamado de cancro do cólon, e no reto, de cancro retal. Quando o tumor se espalha para fora do cólon ou do reto, as células cancerígenas podem ser encontradas nos gânglios linfáticos próximos e, potencialmente, em outros órgãos, como o fígado. ⁽¹⁰¹⁾ A maioria dos tumores no cólon passa por um processo de desenvolvimento em várias etapas, envolvendo uma sequência de mudanças histológicas, morfológicas e genéticas que se acumulam ao longo do tempo. ⁽⁹⁹⁾

1.1.1. Pólipos

A maioria dos cancros colorretais surge a partir de pólipos adenomatosos, dos quais apenas uma minoria evolui para cancro. Estes pólipos podem ser encontrados em cerca de 30% das pessoas de meia-idade e em 50% dos idosos, mas apenas uma pequena percentagem se torna maligna. Alterações moleculares, como mutações genéticas, estão envolvidas na progressão desses pólipos para cancro. Clinicamente, o risco de um pólipo se tornar cancerígeno depende de sua

aparência, características histológicas e tamanho. Após a detecção de um pólipó, recomenda-se a visualização endoscópica de todo o intestino grosso, pois cerca de um terço dos pacientes apresenta múltiplas lesões. A colonoscopia deve ser repetida periodicamente, pois há uma probabilidade significativa de desenvolver outro pólipó ou CCR. ⁽¹⁰²⁾

O CCR geralmente desenvolve-se a partir de alterações focais dentro de pólipos benignos ou pré-cancerígenos. Estes pólipos são um crescimento anormal de células na mucosa intestinal que se projetam para dentro do lúmen intestinal, sendo que estes podem desenvolver-se ao longo de todo o comprimento do cólon e do reto. Com o passar do tempo, as células que se dividem nos pólipos podem acumular alterações genéticas suficientes para ganhar a capacidade de invadir a parede intestinal, que é uma característica distintiva do CCR. Eventualmente, estas células podem sofrer mais alterações e espalhar-se para os gânglios linfáticos próximos e, por fim, para outros locais distantes (metastização). ⁽¹⁰⁰⁾

Existem dois principais tipos de pólipos com potencial maligno: adenomas e pólipos serrados sésseis (SSPs). Ambos têm diferentes riscos de desenvolver tumor colorretal.

Os adenomas túbulo-vilosos e vilosos, geralmente são maiores em tamanho, tendo um maior potencial de abrigar células cancerígenas, levando a que aumente o risco de CCR devido ao aumento do adenoma. Embora apenas cerca de 10% dos adenomas mais avançados se tornem cancerosos, 60% a 70% dos CCRs desenvolvem-se a partir de adenomas. Os 25% a 35% restantes dos CCRs desenvolvem-se a partir de SSPs. ⁽¹⁰⁰⁾

O tempo de evolução de um adenoma para um CCR é estimado em cerca de 10 anos, e a detecção/remoção de adenomas ou tumores em estágio inicial reduzem a mortalidade por CCR. Assim, o CCR é um candidato ideal para um programa de rastreamento do cancro. ⁽¹⁰⁰⁾

1.1.2. Progressão de pólipos para o cancro

À medida que as células dentro do pólipó proliferam, o tamanho do pólipó aumenta, e mutações genéticas e mudanças epigenéticas podem começar a acumular-se, e isso é refletido pela displasia citológica e histológica. Com o tempo, isso pode levar à displasia de alto grau, aumentando assim o risco de um cancro invasivo. Se não forem removidos, os pólipos podem invadir tecidos próximos e espalhar-se para outras partes do corpo. A detecção precoce e a remoção de pólipos são essenciais para interromper essa progressão e prevenir o CCR.

As mutações no DNA podem ser adquiridas ou herdadas. As herdadas, são mutações nos genes MLH1, MSH2, PMS2 e APC, sendo raras e representando cerca de 5% dos CCRs. Existem duas principais vias genéticas que levam ao desenvolvimento do CCR. Estas geralmente correspondem aos dois tipos de pólipos a partir dos quais o CCR se desenvolve: adenomas e SSPs. A via de instabilidade cromossômica, geralmente associada aos adenomas tradicionais, é observada em 65%–70% de todos os cancros espontâneos e é caracterizada por uma cascata de mutações acumulativas. Tipicamente, as primeiras mutações que se desenvolvem estão dentro

do gene APC, que afeta a segregação cromossômica durante a divisão celular. Mutações subsequentes desenvolvem-se no oncogene KRAS, que tem efeitos downstream sobre o crescimento celular, diferenciação, motilidade e sobrevivência. Ao longo do tempo, essas mutações podem causar a perda de função do gene p53, que é um regulador mestre da transcrição e apoptose, impactando assim uma ampla gama de funções celulares que eventualmente resultam em carcinogênese. Em contraste, o desenvolvimento de SSPs tende a começar com mutações no gene BRAF, o que resulta em sinalização de crescimento alterado e perda de apoptose. Mutações no KRAS também podem ocorrer em SSPs, mas são muito menos frequentes. Outra alteração epigenética comum é a hipermetilação anormal de regiões promotoras de genes. A metilação de regiões promotoras inibe a transcrição genética, funcionalmente desativando os genes afetados. Essa inativação de genes impacta muitos outros genes, incluindo aqueles que regulam outros genes promotores de crescimento. Alguns genes associados a essa metilação anormal incluem o gene 3 de proteína morfogénica óssea (BMP3) e o gene 4 regulado a jusante de N-Myc (NDRG4). Outro mecanismo que leva à diversidade genética no CCR é a instabilidade de microssatélites (MSI), que é causada pela interrupção de genes de reparo do DNA. A MSI pode resultar na replicação desigual de sequências de DNA repetitivas em regiões curtas e não codificadoras (microssatélites) e aumentar a suscetibilidade a mutações genéticas adicionais. ⁽¹⁰⁰⁾

1.2. Fatores de risco para Cancro Colorretal

Qualquer pessoa pode desenvolver CCR, existindo vários fatores associados a um aumento do risco desta doença. Alguns dos fatores de risco podem ser modificados, como dieta, obesidade, falta de atividade física, tabagismo e consumo moderado a pesado de álcool. Por outro lado, uma maior ingestão de fibras alimentares, vegetais, vitamina B9 (ácido fólico) e cálcio pode ajudar a proteger contra o desenvolvimento de CCR. No entanto, mesmo alterando estes fatores de risco, não é o suficiente para eliminar a necessidade de exames de triagem para o CCR. Contudo, outros fatores de risco são inalteráveis, como histórico pessoal ou familiar de pólipos colorretais ou cancro colorretal, condições hereditárias, como a síndrome de Lynch, histórico pessoal de doenças inflamatórias intestinais, origens étnico-raciais, e a presença de diabetes tipo 2. O cancro colorretal pode ocorrer tanto no início como no meio da idade adulta, especialmente em pessoas com predisposições hereditárias específicas. A maioria dos casos deste tipo de cancro ocorre em pessoas consideradas de risco médio, sendo a idade o fator de risco mais notável neste grupo. A probabilidade de desenvolver CCR aumenta significativamente após os 50 anos, com 90% dos novos casos e 94% das mortes associadas ao CCR ocorrendo em pessoas com mais de 50 anos. Sendo assim a designação de alto risco inclui indivíduos com história pessoal ou familiar de CCR, pólipos adenomatosos, doença inflamatória intestinal e síndromes hereditárias de CCR. ⁽¹⁰⁰⁾

1.3. Opções de rastreio para o Cancro Colorretal

O rastreio do cancro colorretal é eficaz na redução da mortalidade e na potencial redução da incidência da doença, dependendo do método utilizado. Métodos que envolvem visualização endoscópica, como a sigmoidoscopia flexível e a colonoscopia, têm-se mostrado eficazes na deteção precoce do CCR e na remoção de lesões pré-invasivas, como adenomas. Além disso, testes que detetem a presença de hemoglobina nas fezes, como o teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) demonstraram eficácia no rastreamento do CCR. Atualmente já existem tecnologias mais recentes como é o caso de testes imunoquímicos fecais (iFOBT). Esses métodos de rastreamento são fundamentais para permitir diagnósticos precoces, aumentando assim as chances de tratamento bem-sucedido e uma redução na mortalidade por CCR.

Um teste de rastreio é apenas um evento em um processo de vários passos que inclui a compreensão, teste, confirmação do diagnóstico, tratamento e nova testagem ou vigilância conforme necessário.⁽¹⁰⁴⁾ A característica mais importante de um teste de triagem é sua sensibilidade (a taxa de verdadeiros positivos), que é a percentagem de pacientes com a doença que recebe um resultado positivo no teste. Também importante, mas menos do que a sensibilidade, é a especificidade razoavelmente alta, que é a percentagem de pacientes sem a doença que recebem um resultado negativo (também conhecida como taxa de verdadeiros negativos).⁽¹⁰⁰⁾

A colonoscopia completa pode ser utilizada para o rastreio primário em um único passo. Testes mais simples, como o FOBT ou iFOBT, oferecem a opção de rastreio em dois passos, onde o teste seleciona participantes com maior risco de cancro, que então podem passar por investigação diagnóstica por colonoscopia.

O rastreamento por meio da visualização de uma lesão neoplásica ou pelo teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) é defendido por muitas diretrizes de rastreamento, baseadas na força das evidências publicadas. As diferenças entre o rastreamento endoscópico e o rastreamento menos invasivo por FOBT têm importantes implicações para a participação da população/utente em questão.⁽¹⁰³⁾

A cirurgia é o tratamento principal para pacientes com cancro colorretal que ainda não se terá espalhado para outras partes do corpo. No entanto, o sucesso do tratamento está diretamente ligado à qualidade da cirurgia, ao estágio pré-operatório correto e à escolha adequada do tratamento. Durante a cirurgia, é importante seguir os planos anatómicos do corpo para garantir a remoção completa do tumor.⁽⁹⁸⁾

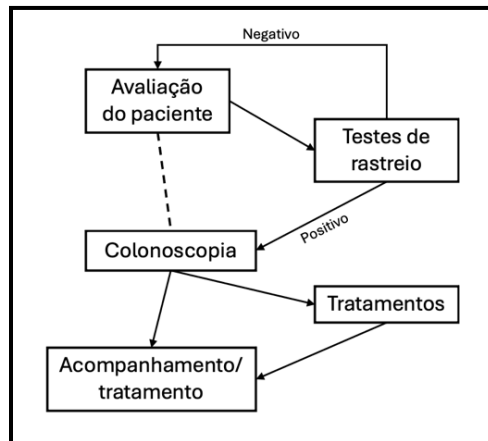


Figura 28: Etapas fundamentais no processo de rastreio de CCR.

1.4. Colonoscopia

A colonoscopia é atualmente o método principal recomendado para a triagem do CCR. É aconselhado realizar este exame a cada 10 anos em pacientes com 50 anos de idade ou mais e que não apresentem um risco aumentado para o desenvolvimento da doença. ⁽⁹⁸⁾

A capacidade da colonoscopia de detetar lesões cancerosas e pré-cancerosas por meio de visualização direta foi demonstrada em vários estudos. A sensibilidade da colonoscopia para detetar o CCR é de 95%, enquanto sua sensibilidade para detetar adenomas avançados (com mais de 10 mm de diâmetro) varia entre 88% e 98%. ⁽⁹⁸⁾

Uma das maiores vantagens da colonoscopia é a capacidade de remover lesões pré-cancerosas e pequenos cancros no momento da deteção. Com esta abordagem, pode-se avaliar tanto as áreas proximais quanto distais do cólon. As limitações associadas à colonoscopia incluem o facto de ser um procedimento invasivo, havendo a necessidade da preparação do intestino do doente, o eventual uso de sedação ou anestesia, o tempo fora do seu trabalho ou de outras atividades e a possível necessidade de assistência para retornar para casa após o procedimento. A preparação do intestino é desagradável e demorada, exigindo uma mudança temporária de hábitos medicamentosos e da dieta, e envolve o uso de um agente de limpeza intestinal. Outro grande risco associado ao procedimento é a perfuração do intestino durante o exame e o risco de sangramento pós-colonosopia, especialmente em pacientes pós-polipectomia. Essas limitações contribuem para a baixa adesão à triagem por colonoscopia. Além disso, há uma grande dependência da experiência técnica dos examinadores endoscópicos para visualizar e remover lesões, especialmente aquelas no cólon proximal, que podem ser mais difíceis de detetar. Pólipos planos ou sésseis podem ser especialmente difíceis de detetar e podem exigir técnicas mais

especiais. Outra limitação é o potencial de "cancro de intervalo", que são casos de CCR que ocorrem durante o longo intervalo entre colonoscopias de triagem, estes foram relatados como responsáveis por cerca de 6% a 9% de todos os casos de CCR. ⁽⁹⁸⁾

Embora a colonoscopia seja o padrão-ouro e a ferramenta de rastreio do CCR mais eficaz, é um método caro e invasivo que requer um especialista qualificado. ⁽¹¹⁰⁾

1.5. Testes de sangue oculto nas fezes (FOBT) e testes imunoquímicos fecais (iFOBT)

Os testes de sangue oculto nas fezes (FOBT) e os testes imunoquímicos fecais (iFOBT) são utilizados com o objetivo de encontrar a presença de sangue nas fezes, usando a hemoglobina como principal indicador. O FOBT tradicional depende da presença do grupo heme nas fezes, este grupo heme reage com o peróxido de hidrogénio o que causa uma mudança de cor (agente cromogénio), mas não consegue distinguir se é hemoglobina humana ou não, sendo esta uma das grandes limitações. Por outro lado, o iFOBT utiliza anticorpos monoclonais e policlonais específicos para a hemoglobina humana, tornando-o mais preciso na deteção de sangue humano. Os testes iFOBT têm a capacidade de detetar, nas fezes, a globina humana, que é uma proteína componente da hemoglobina humana, utilizando anticorpos específicos. Diversos métodos de imunoensaios, como imunocromatografia, imunoturbidimetria e ELISA, são utilizados para detetar a formação dos complexos entre anticorpos e globina. Esta técnica geralmente possui sensibilidade analítica para baixas concentrações de globina e não costuma ser afetada por interferências diretas. ⁽¹⁰³⁾

Existem dois tipos de iFOBT: testes qualitativos, que têm como técnica analítica a imunocromatografia de fluxo lateral e que são geralmente utilizados em locais de *point-of-care* e em alguns laboratórios, e testes quantitativos automatizados que têm como técnica analítica principal a imunoturbidimetria. Os testes quantitativos medem a concentração de hemoglobina numa amostra de fezes contendo uma solução de buffer num analisador automático. Embora a quantidade de hemoglobina medida dependa da quantidade de fezes coletadas, estudos demonstraram consistentemente que esta medida está relacionada com o tipo de doença neoplásica presente. Em suma, a quantidade de sangue nas fezes pode distinguir entre hemorragia gastrointestinal normal e a hemorragia associada a condições neoplásicas. O valor de referência (o valor usado para determinar se o teste é positivo, neste caso, a concentração de hemoglobina nas fezes, também conhecida como concentração de corte "*cut-off*") pode ser ajustado facilmente. Ao ajustar este valor é possível modificar o desempenho dos testes para deferir à sensibilidade e especificidade desejadas para efeitos de triagem. ⁽¹⁰³⁾

Embora estes testes quantitativos automatizados forneçam informações detalhadas, só podem ser realizados em laboratório. Já os testes qualitativos cromatográficos, que geralmente

consistem em kits pré-fabricados prontos a utilizar e onde os resultados são lidos visualmente, em que a presença de um complexo de globina-anticorpo faz com que apareça uma faixa colorida na fita de teste, se a hemoglobina estiver presente na amostra de fezes (testes rápidos). É importante lembrar que os testes fornecidos por diferentes fabricantes têm sensibilidades diferentes para a concentração de hemoglobina nas fezes.

Uma vantagem do método iFOBT é que ele não é afetado pelas hemoglobinas de origem animal ou por compostos encontrados em frutas e vegetais, o que permite que os pacientes continuem com sua dieta habitual. Além disso, os pacientes não precisam interromper o uso de medicamentos que podem interferir com o método tradicional de FOBT.

No iFOBT, a colheita requer menor quantidade de amostra, mas devido à construção moderna dos sanitários, onde as fezes caem diretamente no ralo, a colheita correta da amostra por parte do doente torna-se muito difícil. Com isto, a amostra pode ficar contaminada com resíduos de defecações e micções anteriores, produtos químicos de limpeza de sanitários, desinfetantes e fragrâncias. O método típico de colheita adequada das fezes pode ser desconfortável, pois as fezes devem ser coletadas utilizando um recipiente de plástico especialmente projetado para colheita de fezes, que será entregue posteriormente no laboratório pelos doentes. ⁽¹⁰⁴⁾

Os médicos devem lembrar que os testes químicos de FOB podem ser positivos nos casos de hemorragias de todas as partes do trato-gastrointestinal, enquanto o iFOBT está limitado à detecção de hemorragias no trato-gastrointestinal inferior. Isso ocorre porque a globina do trato-gastrointestinal superior é degradada por enzimas proteolíticas digestivas. Isso foi confirmado por um estudo que demonstrou que até 100 ml de sangue ingerido não foram detetados por alguns dos métodos imunoquímicos, mas terão sido detetados pelo FOBT tradicional no qual é utilizado o agente cromogénico (peróxido de hidrogénio). Houve casos de grandes hemorragias do estômago e do duodeno, originando fezes escuras, onde o iFOBT deu resultados negativos devido à digestão da globina durante a passagem pelo trato-gastrointestinal. No caso de fezes escuras e iFOBT negativo, deve ser suspeitada hemorragia gastrointestinal superior. Além disso, os iFOBTs não são clinicamente específicos para CCR. De facto, patologias não neoplásicas também podem sangrar e fornecer resultados positivos nos testes. Ainda assim, estudos que compararam a especificidade e sensibilidade dos testes de FOB disponíveis comercialmente demonstraram que os testes iFOBT mantêm uma vantagem sobre os testes químicos disponíveis na capacidade de detetar o cancro colorretal. ⁽¹⁰⁴⁾

1.6. Escolha de um teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) para o contexto de rastreio

A consideração das características operacionais dos testes e a sua precisão são essenciais, pois estão ligadas à probabilidade de deteção de neoplasias, às demandas do sistema de saúde e aos benefícios financeiros derivados. Essas características dos testes são divididas em sensibilidade (capacidade de detetar neoplasias) e especificidade (carga no sistema de saúde associado à deteção), a análise é feita por meio de medidas de precisão usadas na análise da curva COR (Curva Característica de Operação do Receptor). É importante notar que a sensibilidade não pode ser ajustada independentemente da especificidade. ⁽¹⁰³⁾

A escolha do teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) deve ter em consideração as necessidades específicas do programa nacional de saúde. Em outras palavras, é importante encontrar um equilíbrio entre a eficácia da deteção, o esforço requerido para realizar os testes e o nível de participação da população. A avaliação de quatro cenários estratégicos principais ajuda a determinar qual FOBT é mais adequado:

Recursos limitados da colonoscopia: A demanda de trabalho gerada pelo rastreio depende da taxa de positividade do teste. Alguns sistemas de saúde optam por limitar essa taxa a cerca de 2-3%, o que permite uma deteção eficiente, mas pode resultar na falta de deteção de alguns tumores e adenomas avançados. Isso pode ser compensado por intervalos de rastreio mais curtos, mas isso aumenta a demanda por colonoscopias ao longo do tempo.

Máxima deteção: Prioriza-se a deteção máxima de cancro e adenomas usando o teste de sangue oculto nas fezes mais sensível, com menos foco na especificidade. Esse método é comum em ambientes de triagem onde a triagem é promovida. Isso levou à introdução do termo "FOBT de alta sensibilidade", que se refere aos testes que têm uma sensibilidade acima de 50% para cancro em apenas uma aplicação.

Equilíbrio na deteção e na demanda de colonoscopias: Trata-se de um compromisso entre maximizar a deteção e minimizar a necessidade de colonoscopias ao realizar rastreio com um teste de sangue oculto nas fezes mais sensível, que não resulta em uma grande demanda por colonoscopias. Isso equivale a escolher um valor preditivo positivo (VPP) ótimo para um determinado ambiente de rastreio.

A comparação entre dispositivos e sistemas iFOBT tem sido abordada em um número limitado de estudos. Enquanto há uma variedade de produtos qualitativos disponíveis no mercado, o número de dispositivos quantitativos está gradualmente a aumentar. No entanto, esses estudos diferem em termos de tamanho, dispositivos testados, métodos e resultados, o que torna a comparação entre eles desafiadora. ⁽¹⁰³⁾

A sensibilidade e especificidade do iFOBT são mostradas em 13 estudos na Figura 3, na qual se pode constatar a relação curvilínea esperada entre sensibilidade e especificidade. Isto demonstra que é possível escolher facilmente um iFOBT com alta sensibilidade para o CCR (à custa de uma especificidade reduzida) ou um com alta especificidade e, com isso, uma maior taxa de positividade no rastreio, alcançando ainda uma sensibilidade para o cancro acima dos 50%. ⁽¹⁰³⁾

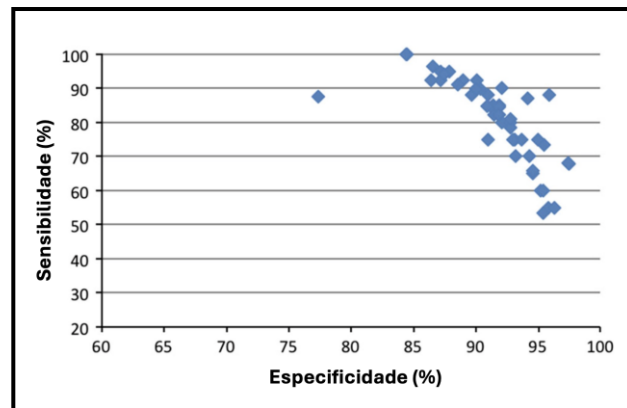


Figura 29: Sensibilidade e especificidade relacionadas para CCR em uma faixa de testes iFOBT. Figura adaptada do artigo⁽¹⁰³⁾.

É pouco usual um programa de rastreio por iFOBT que exija mais do que uma ou duas amostras fecais. No entanto, vários estudos indicaram que duas amostras oferecem melhor sensibilidade e especificidade para a deteção de cancro. Foi demonstrado também que realizar 1 ou 2 testes iFOBT não afetou o resultado. A positividade é maior com múltiplas amostras coletadas, e terá sido alcançada sem aumentar significativamente o número de colonoscopias necessárias para detetar neoplasias, embora isso dependesse do *cut-off* utilizado. ⁽¹⁰³⁾

Como indicado acima, na escolha de um iFOBT quantitativo, o *cut-off* poderá ser ajustado para se adequar a um cenário de rastreio. Como tal, a sensibilidade é menor e a positividade é maior quando se escolhe uma baixa concentração de hemoglobina para o *cut-off*, enquanto a especificidade e o valor preditivo positivo são mais altos em uma concentração alta. Rozen et al. [116] descobriram que uma especificidade de 95% para o CCR (considerada apropriada para um rastreio de médio risco) foi alcançada com um iFOBT quantitativo de uma amostra com um *cut-off* de hemoglobina de 100 ng/mL no tampão da amostra (equivalente a 20 µg de Hb/g de fezes), enquanto duas ou três amostras com um *cut-off* de 50 ng/mL (10 µg de Hb/g de fezes) aumentaram a sensibilidade, mas diminuíram a especificidade para 90,2% - 87,8% e aumentaram também a carga de trabalho de colonoscopias. Estudos semelhantes em outras populações não retornam os mesmos valores, e ao escolher um teste para triagem, as características operacionais do teste precisam ser determinadas na população-alvo pretendida. No entanto, os iFOBT são altamente flexíveis. Tabela 18. ^(103,116)

Tabela 18: Benefícios da utilização de iFOBTs. ⁽¹⁰⁹⁾

| Testes Imunoquímicos Fecais iFOBT: |
|--|
| Possibilidade de utilizar apenas uma amostra de fezes |
| Fezes coletadas utilizando um bastão que é reinserido num tubo de plástico |
| Análise automática para fornecer a concentração de Hb nas fezes |
| Permite um <i>cut-off</i> ajustável para positividade do teste |
| Deteta a porção globina do sangue (específico para humanos) |
| Menos suscetível à interferências dietética |
| Uma maior sensibilidade analítica |
| Uma melhor sensibilidade clínica para cânceres e adenomas |

Assim, qual dos testes de rastreio para o CCR e deve utilizar?

Como anteriormente referido, é importante fazer o rastreio do cancro colorretal e, como tal, diferentes testes têm diferentes vantagens e desvantagens, daí a decisão de qual o melhor teste de rastreio ser tão importante para a obtenção de um resultado de rastreio credível. Essa decisão tem de ter em conta diferentes aspetos tais como:

- A idade da pessoa, histórico médico, histórico familiar e saúde geral;
- Danos possíveis durante o teste;
- A preparação necessário para o teste;
- Se a sedação pode ser necessária para o teste;
- Os cuidados de acompanhamento após o teste;
- A conveniência do teste;
- O custo do teste;

Tabela 19. Resumo das principais características dos diferentes testes de rastreio colorretal que se podem querer considerar ao escolher um teste. ⁽¹¹³⁾

| Teste | Dieta específica e alterações na medicação antes do teste: | Procedimento invasivo: | Preparação (limpeza do intestino necessária): |
|---------------------|---|-------------------------------|--|
| Fezes | Não no caso do FIT | Não | Não |
| Colonoscopia | Sim | Sim | Sim |

1.7. Causas de positividade

As positivities nos testes iFOBT em programas de rastreio podem vir a variar devido a diversos fatores tais como:

- Diferenças demográficas: Os homens têm taxas de testes positivos mais altas do que as mulheres, assim como pessoas mais velhas e provenientes de meios economicamente desfavorecidos;
- Variação geográfica: A distribuição da concentração de hemoglobina fecal difere entre países;
- Histórico de rastreio: Doentes que já foram testados anteriormente tendem a ter taxas de positividade diferentes daquelas que estão a fazer o teste pela primeira vez;
- Temperatura ambiente: A temperatura ambiente pode afetar a positividade do teste, com temperaturas mais altas associadas a uma diminuição na hemoglobina nas amostras, muito provavelmente devido a degradação;
- Histórico pessoal de neoplasia colorretal e distúrbios hemorrágicos benignos podem influenciar os resultados;
- Outros fatores não neoplásicos podem afetar a positividade dos testes tais como, medicação, sendo que o uso de antiplaquetários aumenta a taxa de positividade.

Estas diferenças e os diversos fatores que podem afetar a positividade do teste são importantes para entender e interpretar os resultados dos estudos de rastreio populacional do cancro colorretal. ⁽¹⁰³⁾

O teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) e o teste imunocromatográfico fecal (iFOBT), apresentam um grande grau de flexibilidade na implementação de testes de rastreio para a deteção de CCR. Destes, destaca-se o iFOBT quantitativo, visto que é o que oferece maior flexibilidade, permitindo a escolha do intervalo de rastreio, o número de amostras e os critérios de positividade do teste podem ser ajustados para entender as necessidades do próprio programa de rastreio e dos indivíduos. Como tal, devem ser realizados vários testes pilotos para verificar a eficácia em diferentes cenários de rastreio, podendo ser utilizado como controlo da carga de trabalho das colonoscopias ou com o propósito de maximizar a deteção de neoplasias, ajustando-se sempre o *cut-off* para os diferentes cenários. O iFOBT quantitativo é recomendado devido à sua capacidade de ajustar os critérios de *cut-off* nos resultados e por quantificar a hemoglobina presente podendo assim classificar o tipo de hemorragia do doente. ⁽¹⁰³⁾

1.8. Possíveis Desvantagens

Diversos elementos relacionados à utilização do FOBT merecem uma atenção especial, tais como:

- O número de amostras fecais é um aspeto importante, enquanto o FOBT tradicional utiliza três amostras de diferentes dias, o iFOBT apresenta um melhor desempenho com apenas uma ou duas amostras. Aumentar o número de amostras pode melhorar a sensibilidade, mas geralmente reduz a especificidade.
- Com a utilização de iFOBT quantitativo é possível variar independentemente o número de amostras e o limite para a positividade. Como consequência, utilizando o iFOBT quantitativo, os programas tendem a escolher um limite de 10–30 µg de Hb/g de fezes ao testar apenas uma amostra, em comparação com 20–40 µg de Hb/g de fezes ao testar duas amostras. Para a deteção do cancro, há pouca diferença entre essas opções, mas foi apontado que para a deteção de adenomas é melhor quando duas amostras são testadas.
- O segundo problema é determinar o limite a ser utilizado no teste. Isso depende do cenário de rastreio escolhido, que terá de ser apoiado por estudos piloto na população-alvo. O resultado do teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) indica a probabilidade de cancro colorretal estar presente. Portanto, o cenário de rastreio selecionado ajuda a identificar o limite mais apropriado para o teste. ⁽¹⁰⁴⁾

1.9. Métodos imunoquímicos, ligação antigénio-anticorpo

Os métodos imunoquímicos são baseados numa reação específica e sensível entre um antigénio e um anticorpo. O antigénio é uma substância que induz a produção de anticorpos que são produzidos no sistema imunitário de qualquer vertebrado, incluindo do humano, como resultado de uma reação de defesa (imunidade) a uma substância estranha. Os anticorpos são uma grande família de glicoproteínas que partilham propriedades funcionais e estruturais chave para o organismo. Funcionalmente, podem ser ligar a antigénios. Dentro dos diferentes ensaios a realizar neste contexto, os ensaios imunoturbidimétricos de micropartículas podem ser utilizados para a medição quantitativa de fármacos ou biomarcadores em fluidos corporais. Os ensaios são baseados numa reação de aglutinação induzida pela ligação antigénio-anticorpo. ⁽¹⁰⁸⁾

1.10. FOB Turbilatex® Combo (CerTest)

O FOB Turbilatex® é um ensaio turbidimétrico em látex para a detecção de hemoglobina quantitativamente em amostras de fezes humanas. Este teste foi desenhado para ser realizado em analisadores automáticos como é o caso do Architect c8000 da Abbott, um equipamento que tem como técnicas principais o método fotométrico e potenciométrico. Trata-se de um ensaio turbidimétrico em látex que se baseia na reação de aglutinação, esta implica uma agregação *in vitro* de partículas microscópicas de latex. Esta agregação consiste na reação específica entre antigénio e anticorpo, concretamente entre o antigénio presente na amostra e os anticorpos anti-antigénio ligados às partículas de látex polistireno. A amostra é misturada com uma suspensão que contem anticorpos contra o antigénio ligado às partículas de látex. Caso o antigénio esteja presente na amostra, este vai reagir com os anticorpos e formar um agregado; se o antigénio não estiver presente na amostra, a mistura mantém a aparência de uma suspensão homogénea. A turbidez provocada é medida como um aumento da absorvência a um determinado comprimento de onda (500 nm) que é então proporcional à quantidade de antigénio presente na amostra. ^(105,106)

1.11. NADAL® FOB (Nal Von Minden)

O teste NADAL® FOB é um imunoensaio visual e rápido para a detecção qualitativa de hemoglobina humana em amostras fecais. Destina-se ao auxílio no diagnóstico de patologias do trato gastrointestinal inferior. O teste deteta hemoglobina humana em amostras fecais através de uma mudança de cor na tira. Anticorpos específicos imobilizados na membrana reagem com hemoglobina conjugada com partículas coloridas. A mistura migra então ao longo da membrana por ação capilar e interage com os componentes na membrana. Se houver hemoglobina suficiente, uma linha colorida aparece na região do teste, indicando assim um resultado positivo. A ausência dessa linha indica um resultado negativo. Uma linha colorida na região de controlo confirma que a amostra foi corretamente adicionada e que a absorção ocorreu corretamente. Os pacientes devem evitar recolher amostras durante o período menstrual, três dias antes e depois, se tiverem hemorragias devido a hemorroidas, sangue na urina ou grandes esforços ao evacuar. Álcool, aspirina e outras medicações em excesso podem causar irritação gastrointestinal e devem ser suspensas pelo menos 48 horas antes da análise. Não são necessárias restrições dietéticas antes da análise. ⁽¹⁰⁷⁾

2. Objetivos do Projeto de Investigação

No laboratório de microbiologia do SPC no Unidade Local de Saúde Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira a pesquisa de sangue oculto nas fezes na rotina é concebida por meio de um teste rápido NADAL® FOB (Nal Von Minden) que tem como técnica um imunoensaio visual, para a deteção qualitativa de hemoglobina humana em amostras fecais. Este teste rápido apresenta um *cut-off* de 40 ng/mL, sendo todas as amostras positivas para concentrações iguais ou superiores a este valor estipulado pelo fabricante.

Atualmente a CerTest Biotec apresenta uma nova técnica para a pesquisa de sangue oculto nas fezes o FOB Turbilatex® Combo. O FOB Turbilatex® é um teste que usa a técnica de turbidimetria com partículas de látex para medir quantidades de hemoglobina nas fezes, indicando a presença de sangue oculto. Apresenta um *cut-off* de 50 ng/mL podendo este ser modificado de forma a dar os melhores resultados segundo as exigências do laboratório. É bastante fácil de realizar e possui diversas aplicações. Além disso, foi desenvolvido para funcionar de forma otimizada em analisadores automáticos específicos, como os modelos Architect c4000/c8000/c16000 e Alinity c-series da Abbott.

Desta forma, o objetivo deste projeto de investigação foi avaliar a utilidade de um novo kit comercial automatizado por turbidimetria – FOB Turbilatex® para medir a quantidade de hemoglobina humana presentes em amostras de fezes na rotina do SPC, comparando os resultados com o kit NADAL® FOB já utilizado pelo serviço no laboratório de microbiologia.

(105,107)

3. Material e métodos

3.1. Recolha de dados

Para a elaboração deste projeto de investigação foram recolhidas por rotina do laboratório amostras de fezes para a pesquisa de sangue oculto, durante o período de dezembro de 2023 e abril de 2024. Os dados utilizados foram os resultados da presença de sangue oculto nas fezes determinado pelo kit NADAL® FOB no laboratório de microbiologia do SPC através do software existente no hospital, o *Modulab*, sendo tratados de forma anónima e com o consentimento da comissão de ética do ULS CHUCB (estudo N° 24/2024 – em Anexo foi incluído o Parecer da Comissão de Ética do CHUCB).

Foram recolhidas por rotina do laboratório 137 amostras de fezes numerados (fezes 1, fezes 2 e fezes 3) num total de 49 doentes, para a pesquisa da presença de sangue oculto nas fezes. Para uma maior coerência do estudo, foram retirados 5 doentes que não apresentavam as três fezes e foram retirados também 4 doentes devido a erros no registo das amostras. Obteve-se, assim, um total de 40 doentes e 120 amostras devidamente numeradas. Desses 40 doentes, 19 (47,5%) são do sexo masculino e 21 (52,5%) são do sexo feminino. A média das idades foi de 65,2 anos, mas em específico para o sexo masculino a média das idades era de 64,5 anos e para o sexo feminino a média foi de 65,7 anos. Consoante a informação da bula do teste FOB Turbilatex® Combo (CerTest) os doentes foram classificados em função da concentração de hemoglobina nas amostras de fezes como: normais para concentrações menos que 50 ng/mL (não são indicativos de sangramento trato gastrointestinal), presença anormal para uns valores de hemoglobina entre 50 a 200 ng/mL (leve sangramento) e, por fim, anormal para valores superiores a 200 ng/mL (forte sangramento).

3.2. Processamento das amostras

A pesquisa de sangue oculto foi realizada utilizando o kit FOB Turbilatex® Combo (CerTest) e as amostras foram analisadas pelo analisador automático Architect c8000 da Abbott. As amostras foram processadas consoante a bula presente no kit (Universal Turbilatex Sample Collection Vial). A recolha da amostra e preparação consistiu em obter uma quantidade suficiente de fezes (1-2 g, ou mL para amostras líquidas) sendo que as amostras de fezes foram recolhidas em recipientes limpos e secos (sem conservantes ou meios de transporte) para entrega no laboratório. As amostras que não foram submetidas a testes imediatamente após a chegada ao laboratório foram congeladas a -20°C, podendo estar neste estado, se necessário, até 6 meses. As amostras foram todas congeladas até ao período determinado para a extração e análise.

Como já referido, no global do projeto foram feitas quatro extrações com um total de 120 amostras. A extração consistiu na introdução do bastão nas fezes em quatro zonas diferentes para garantir uma melhor amostragem e que a quantidade retirada é suficiente para a deteção. Antes de colocar o bastão no tubo de diluição, removeu-se o excesso de fezes, rodando o bastão na parede interna do recipiente das fezes. Após a remoção do excesso o bastão da amostra foi

introduzido no tubo de diluição que contém a solução de extração. Cada tubo foi agitado em vortex durante 30-60 segundos para homogeneizar adequadamente o conteúdo de modo que as ranhuras do bastão fiquem sem amostra. Após a agitação no vortex, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 2000rpm para remover qualquer material fecal residual, que possa danificar os sistemas de aspiração e dispensa dos analisadores automáticos, que neste caso foi o Architect c8000. Para concluir a extração foram removidos os dispositivos da recolha das amostras, ficando só o tubo com a solução diluída para análise. O tubo da diluição das amostras com a amostra diluída pode ser armazenado durante 7 dias num frigorífico a 2-8°C antes do teste, caso seja necessário.

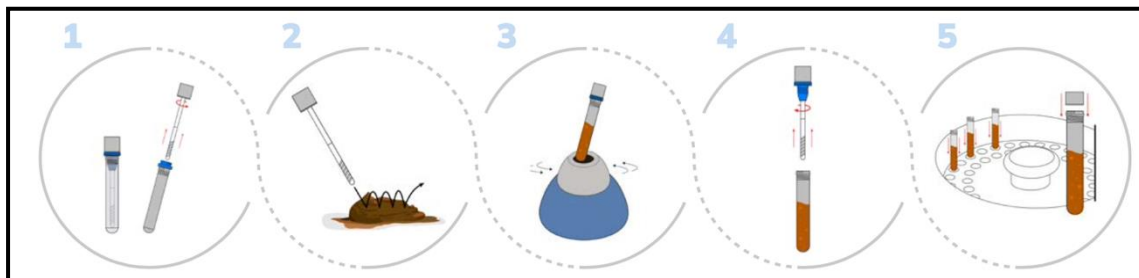


Figura 30: Processamento da amostra. Figura adaptada da bula do kit FOB Turbilatex® Combo (CerTest).⁽¹⁰⁵⁾

Por fim, antes de colocar as amostras no equipamento foram realizados controlos, para garantir que o valor de referência se mantém ou se será necessário realizar algum tipo de calibração com os calibradores disponibilizados com o kit.

As amostras são então levadas ao equipamento Architect c8000 nos respetivos tubos, onde é medida a concentração de hemoglobina de cada amostra através do referido método turbidimétrico. Os resultados ficam disponibilizados após 10-15 minutos no software do equipamento.

3.3. Análise estatística

A análise estatística teve como variáveis os seguintes parâmetros: número do processo, número do pedido, sexo, idade, data da colheita, serviço de onde foi feito o pedido e, por fim, o diagnóstico para os doentes que estavam situados num intervalo de idades entre 50 e 88 anos. Fez-se divisão entre sexo masculino (47,5%) e sexo feminino (52,5%), e as idades foram avaliadas como valor absoluto, obtendo-se uma idade média total de 65 anos. Os dados foram trabalhados por data da colheita, que ocorreu de dezembro de 2023 a abril de 2024.

No que diz respeito aos serviços de onde foram feitos os pedidos não foram os esperados para se poder efetuar uma análise estatística como se tinha pretendido no início do projeto. A maior parte das amostras que chegaram ao laboratório de patologia clínica do ULS CHUCB para pedidos da pesquisa de sangue oculto vieram de extensões de unidades de saúde de centros de saúde da zona da Covilhã e Fundão. Como tal, estes doentes não eram portadores de um diagnóstico preliminar. Devido a esta falta de informação dos doentes não foi possível realizar uma análise estatística para obtenção de sensibilidade, especificidade, valor positivo predicativo, valor predicativo negativo, taxa de falsos positivos e falsos negativos, onde as proporções de resultados positivos nos testes de iFOBT e colonoscopia são verdadeiros positivos.

Todos os dados obtidos dos testes do kit FOB Turbilatex® Combo (CerTest) foram analisados através do Microsoft Excel. As variáveis em estudo são caracterizadas pela percentagem ou contagem e média.

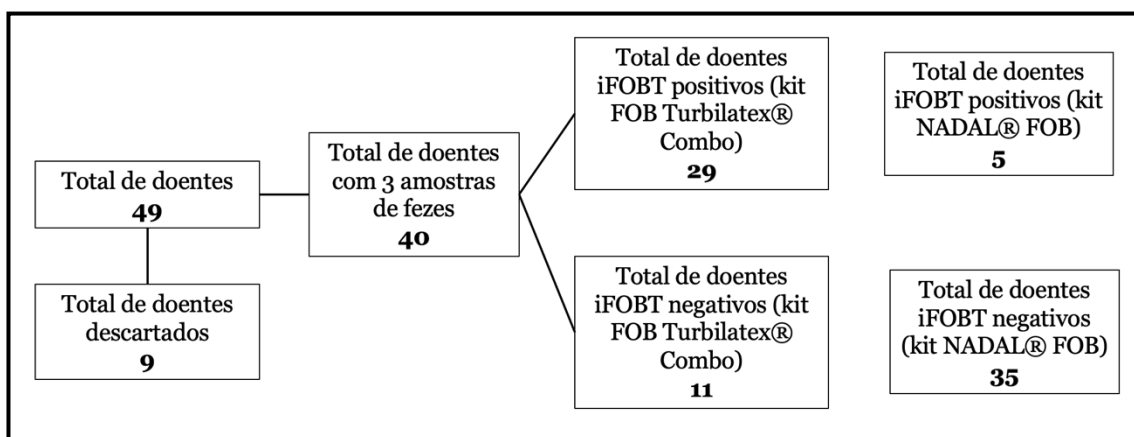


Figura 31: Resumo dos testes imunológicos da pesquisa de sangue oculto nas fezes (iFOBT).

4. Resultados

Durante o período de dezembro de 2023 a abril de 2024 foram estudadas 137 amostras de fezes no SPC do ULS CHUCB. Utilizando os critérios de seleção anteriormente referidos, para este estudo, foram só aceites 120 amostras. Dos 40 doentes estudados, estes tinham entregado no laboratório três amostras de fezes devidamente numeradas. Os resultados obtidos foram organizados numa tabela, por ordem de chegada ao laboratório, sendo que os valores de concentração de hemoglobina foram arredondados a duas casas decimais para uma melhor compreensão dos resultados e manuseamento dos dados. A média das concentrações de hemoglobina para as três amostras de cada doente foram calculadas.

Segundo a bula presente no kit FOB Turbilatex® Combo (CerTest), as concentrações de hemoglobina presente nas fezes são classificadas da seguinte maneira: ⁽¹⁰⁶⁾

- Concentrações inferiores a 50 ng/mL são consideradas normais / não são indicativos de sangramento trato-gastrointestinal (classificado como negativo);
- Concentrações de 50-200 ng/mL são consideradas anormal / leve sangramento (50-100 ng/mL foi classificado como positivo fraco e de 100-200 ng/mL como positivo);
- Concentrações superiores a 200 ng/mL são anormais / forte sangramento (classificado como positivo).

Relativamente ao kit NADAL® FOB atualmente utilizado pelo SPC no laboratório de microbiologia para a pesquisa de sangue oculto nas fezes a bula classifica positivo amostras com uma concentração igual ou superior a 40 ng/mL. ⁽¹⁰⁷⁾

No entanto, no que diz respeito aos resultados obtidos, existe uma discrepância evidente perante os dois kits testados, pois o kit cromatográfico com um *cut-off* de 40 ng/mL apresenta uma grande percentagem de discordância (65%) relativamente ao kit turbidimétrico quantitativo no que diz respeito ao número de resultados positivos.

Tabela 20: Resultados da concentração de hemoglobina presentes nas amostras (1,2 e 3) de fezes para cada um dos 40 doentes em estudo.

| Doente | Idade | Fezes 1 (ng/mL) | Fezes 2 (ng/mL) | Fezes 3 (ng/mL) | Média (ng/mL) |
|--------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| D1 | 69 anos | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| D2 | 80 anos | 69,59 | 10,00 | 35,15 | 38,25 |
| D3 | 62 anos | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| D4 | 87 anos | 10,00 | 26,88 | 18,23 | 18,37 |
| D5 | 70 anos | 24,25 | 15,60 | 24,25 | 21,37 |
| D6 | 55 anos | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| D7 | 80 anos | 10,00 | 10,00 | 23,87 | 14,62 |
| D8 | 75 anos | 23,50 | 10,00 | 10,00 | 14,50 |
| D9 | 88 anos | 10,00 | 24,25 | 73,24 | 35,83 |
| D10 | 71 anos | 97,20 | 97,43 | 84,34 | 92,99 |
| D11 | 55 anos | 67,79 | 93,74 | 90,72 | 84,08 |
| D12 | 63 anos | 122,95 | 114,15 | 111,59 | 116,23 |
| D13 | 69 anos | 65,44 | 86,24 | 69,91 | 73,86 |
| D14 | 59 anos | 77,29 | 63,76 | 74,83 | 71,96 |
| D15 | 66 anos | 56,15 | 26,07 | 91,16 | 57,80 |
| D16 | 53 anos | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| D17 | 54 anos | 80,43 | 85,23 | 46,07 | 70,58 |
| D18 | 57 anos | 87,92 | 114,15 | 110,25 | 104,11 |
| D19 | 69 anos | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| D20 | 63 anos | 78,97 | 81,88 | 53,02 | 71,29 |
| D21 | 68 anos | 113,37 | 127,40 | 58,05 | 99,61 |
| D22 | 50 anos | 57,38 | 50,45 | 95,53 | 67,79 |
| D23 | 64 anos | 77,40 | 76,51 | 116,82 | 90,25 |
| D24 | 74 anos | 98,32 | 103,79 | 115,82 | 105,98 |
| D25 | 56 anos | 117,27 | 114,82 | 93,29 | 108,46 |
| D26 | 71 anos | 88,59 | 92,51 | 81,21 | 87,43 |
| D27 | 52 anos | 90,94 | 73,60 | 72,71 | 79,08 |
| D28 | 62 anos | 105,68 | 78,08 | 69,13 | 84,30 |
| D29 | 58 anos | 119,16 | 102,12 | 110,92 | 110,73 |
| D30 | 54 anos | 140,44 | 131,41 | 127,29 | 133,05 |
| D31 | 64 anos | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| D32 | 51 anos | 11,43 | 108,02 | 125,84 | 81,76 |
| D33 | 75 anos | 27,50 | 10,00 | 93,29 | 43,60 |
| D34 | 74 anos | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| D35 | 60 anos | 143,89 | 103,12 | 97,43 | 114,81 |
| D36 | 64 anos | 23,93 | 64,77 | 51,79 | 46,83 |
| D37 | 69 anos | 94,85 | 88,59 | 91,61 | 91,69 |
| D38 | 66 anos | 128,74 | 138,10 | 136,43 | 134,42 |
| D39 | 64 anos | 74,27 | 51,34 | 74,27 | 66,63 |
| D40 | 65 anos | 109,36 | 87,02 | 59,40 | 85,26 |

Tabela 21: Comparação dos resultados dos dois kits diferentes.

| Doente | Fezes 1 kit NADAL® FOB | Fezes 2 kit NADAL® FOB | Fezes 3 kit NADAL® FOB | Fezes 1 kit FOB Turbilatex® | Fezes 2 kit FOB Turbilatex® | Fezes 3 kit FOB Turbilatex® |
|--------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| D1 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D2 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo Fraco | Negativo | Negativo |
| D3 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D4 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D5 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D6 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D7 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D8 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D9 | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco |
| D10 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D11 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D12 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| D13 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D14 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D15 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Negativo | Positivo Fraco |
| D16 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D17 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Negativo |
| D18 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo | Positivo |
| D19 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D20 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D21 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo Fraco |
| D22 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D23 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo |
| D24 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo | Positivo |
| D25 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo Fraco |
| D26 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D27 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D28 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D29 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| D30 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| D31 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D32 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| D33 | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco |
| D34 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| D35 | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo Fraco |
| D36 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D37 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D38 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| D39 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo Fraco | Positivo Fraco | Positivo Fraco |
| D40 | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo Fraco | Positivo Fraco |

A ordem e idade dos doentes foi mantida a mesma que na tabela 20. A percentagem de concordância foi de 35% e a de discordância foi de 65%.

A tabela 21 anterior revela claramente uma disparidade entre resultados perante as duas técnicas diferentes. No kit NADAL® FOB os resultados foram retirados do software do laboratório (Modulab), visto que estes foram processados pelos técnicos responsáveis pelo laboratório de microbiologia do SPC no ULS CHUCB. Os resultados do kit FOB Turbilatex® Combo (CerTest) foram obtidos no equipamento e transcritos para uma tabela para posteriormente serem classificados.

Foi observado como esperado uma maior sensibilidade para a deteção de hemoglobina nas fezes pelo kit quantitativo o que leva a um maior número de doentes positivos comparativamente ao kit qualitativo. Muitos doentes foram classificados com sangramento como podemos observar no gráfico 1 seguinte. No gráfico 1 estão apresentadas as concentrações médias de hemoglobina em ng/mL das três amostras de fezes, observando-se uma grande proporção de amostras com concentração superior a 50 ng/mL até 135 ng/mL, o que revela sangramento, segundo a técnica turbidimétrica.

No gráfico 2, de dispersão, foram colocadas as idades por ordem crescente de doentes, os quais tinham uma distribuição entre 50 anos e 88 anos, em comparação com a concentração média de hemoglobina das três amostras de cada doente.

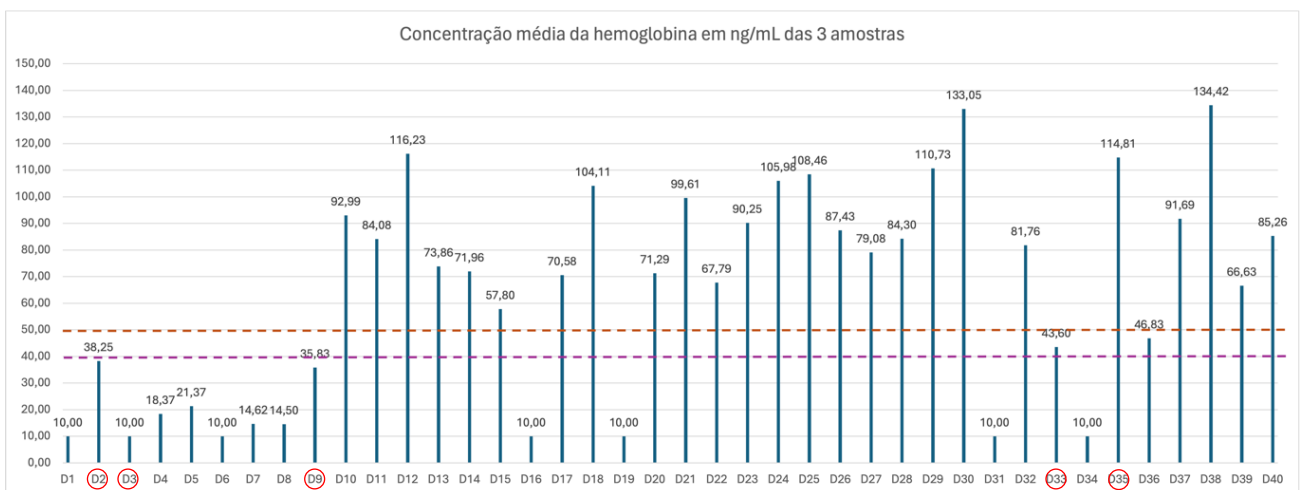


Figura 32: Gráfico 1 Concentração média da hemoglobina em ng/mL das 3 amostras, a laranja o *cut-off* do kit FOB Turbilatex® Combo (50 ng/mL) e a roxo o *cut-off* do kit NADAL® FOB (40 ng/mL).

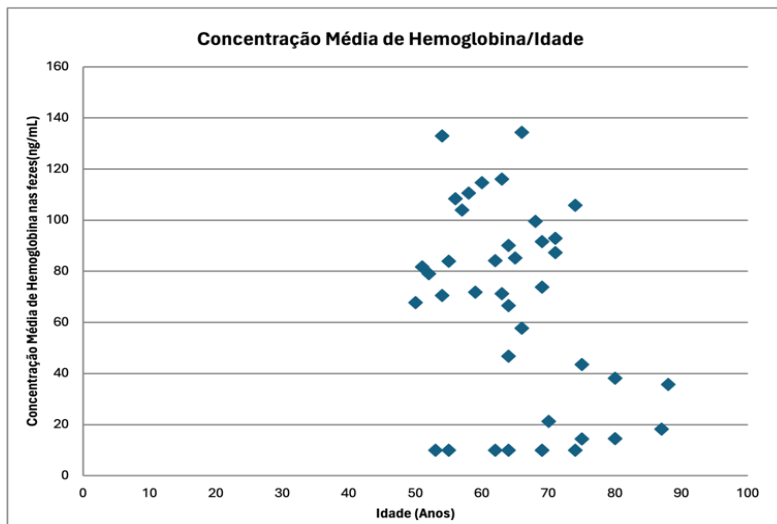


Figura 33: Gráfico 2 Concentração Média de hemoglobina / idade dos doentes estudados.

5. Discussão de resultados

Vários estudos demonstraram que para a deteção do CCR em estágios iniciais ou pré-cancerígena, em que ainda é possível a cura, vários países e regiões iniciaram programas de rastreio ao CCR à população. Utilizam-se diversos métodos e tecnologias para executar o rastreio. Como os adenomas e tumores no intestino grosso tendem a sangrar, um método muito eficaz é o teste imunoquímico fecal (iFOBT), que é capaz de identificar e quantificar pequenas quantidades de hemoglobina humana em amostras de fezes. ⁽¹¹²⁾

Embora a colonoscopia seja considerado o método padrão e mais eficaz para o rastreio de CCR, este é um procedimento caro e invasivo, que requer um profissional de saúde qualificado. Um método mais simples, rápido e não invasivo para o rastreio do cancro colorretal é o uso do teste imunoquímico para a pesquisa de sangue oculto nas fezes (iFOBT), sendo mais adequado para uma aplicação em larga escala na população. Embora a eficácia não seja superior à colonoscopia, a eficácia do iFOBT em detetar CCR e reduzir a mortalidade está muito bem estabelecida. De facto, num estudo de acompanhamento durante 30 anos onde foi utilizado iFOBT para rastreio mostrou-se que este proporcionou uma redução de mortalidade a longo prazo de 32% para rastreio anual e 18% para rastreio bianual. ^(103,113)

Na prática do rastreio do cancro colorretal, os testes imunoquímicos fecais (iFOBT) são utilizados como testes dicotómicos, onde são utilizados cut-offs para a positividade ou negatividade do teste já predefinidos pelo fabricante. A base para determinar estes cut-offs geralmente não é conhecida pelo utilizador do iFOBT quantitativo, limitando-se assim a adotar um cut-off específico recomendado, podendo este não ser a melhor escolha para a aplicação dos iFOBT em muitas situações. ⁽¹¹³⁾

A especificidade do teste imunoquímico de sangue oculto fecal foi quase 90% para prever o cancro colorretal, adenoma ou outras lesões importantes no trato gastrointestinal inferior. Estes resultados apoiam os de estudos anteriores que mostram que o teste fecal imunoquímico é uma ferramenta de diagnóstico específica. Além disso, a sensibilidade do teste foi de 25% para neoplasias no cólon e 96% para cancro colorretal, resultados que são consistentes com a maioria dos resultados de estudos anteriores que avaliaram o teste fecal imunoquímicos em populações do Oriente ou do Ocidente. ⁽¹¹⁴⁾

O teste iFOBT quantitativo está a ser utilizado em programas de rastreio baseados na população em muitos países, incluindo Japão, Itália, Eslovénia, Austrália, Taiwan, Canadá, Irlanda, Malta e nos Países Baixos. A capacidade de medir a quantidade de globina presente na amostra do teste iFOBT permite que um programa de rastreio utilize uma concentração de Hb que define um teste positivo e o uso de um *cut-off* definido pelo programa. Esta escolha do *cut-off* permite uma seleção local da sensibilidade e especificidade clínica do teste, bem como uma taxa de

referência positiva que é adaptada às limitações dos recursos locais de colonoscopia. A escolha do *cut-off* da concentração de Hb fecal é crucial para o sucesso de um programa de rastreio. ⁽¹⁰⁸⁾

Os resultados deste projeto de investigação revelam que o kit FOB Turbilatex® Combo turbidimétrico quantitativo apresenta uma grande quantidade de amostras de fezes com resultados positivos para um *cut-off* superior a 50 ng/mL comparativamente ao kit NADAL® FOB cromatográfico qualitativo que tem um *cut-off* de 40 ng/mL, ambos os valores estabelecidos pelos fabricantes, como podemos ver na tabela 21 e gráfico 1. Como esperado, os resultados obtidos com o kit turbidimétrico quantitativo indicaram uma maior sensibilidade e especificidade na deteção de sangue oculto nas fezes em comparação com o kit cromatográfico qualitativo utilizado pelo SPC no laboratório de microbiologia. Esta maior sensibilidade e especificidade é coincidente com o que é reportado na literatura, onde métodos quantitativos tendem a ser mais sensíveis e específicos na deteção de sangue oculto nas fezes. ^(105,115) A alta taxa de resultados positivos indica uma capacidade superior de detetar pequenas quantidades de sangue, o que é crucial para o diagnóstico precoce de patologias gastrointestinais.

A maior sensibilidade do kit quantitativo indica que este pode ser uma ferramenta mais eficaz na triagem de doenças gastrointestinais do trato-gastrointestinal inferior, especialmente em um programa de rastreio onde a deteção prematura é essencial. No entanto, não foi possível confirmar os diagnósticos dos doentes, uma vez que as amostras chegadas ao laboratório do SPC do ULS CHUCB eram maioritariamente provenientes de extensões de unidades de saúde (centros de saúde da zona da Covilhã e Fundão) sem diagnósticos confirmados. Todavia, a falta de informação dos diagnósticos limita a capacidade de validar a eficácia clínica destes resultados e, sucessivamente, do kit em questão.

No entanto, pela análise bibliográfica consultada ⁽¹¹³⁻¹¹⁶⁾, os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a superioridade dos métodos quantitativos na deteção de sangue oculto nas fezes, pelo que os testes quantitativos iFOBT são mais sensíveis e fornecem resultados mais consistentes. No entanto, alguns destes estudos apontam para a possibilidade de falsos positivos, que pode ser uma das limitações importantes a considerar.

Uma das principais limitações deste estudo foi a incapacidade de confirmar os diagnósticos dos doentes, devido à origem das amostras, como já referido anteriormente. Como tal, esta limitação impossibilita uma análise estatística completa e a validação dos resultados. Além disso, o número de amostras também foi um fator limitante do estudo, pois perante um objetivo comparativo, seria necessária uma maior quantidade de amostras com a possibilidade de se formar uma população controlo para uma maior validação estatística, como observado na bibliografia. ⁽¹¹³⁻¹¹⁶⁾

Futuras pesquisas devem incluir uma maior amostragem e também a garantia do acesso a diagnósticos confirmados para validar a eficácia dos testes. Investigações adicionais sobre a taxa de falsos positivos e negativos também são necessárias para avaliar a precisão do teste quantitativo. Seria benéfico realizar estudos comparativos entre diferentes *cut-offs* relativamente ao kit FOB Turbilatex® Combo de maneira a selecionar o melhor *cut-off* para a população em questão, garantido assim ainda uma maior especificidade e sensibilidade

relativamente a população. Perante a análise do gráfico 1 poderá ser necessário um ajuste no *cut-off* do kit FOB Turbilatex® Combo, visto que diferentes populações tem diferentes características no que diz respeito a concentração de hemoglobina nas fezes.

Um estudo piloto na Escócia utilizou o sistema FIT OC-SENSOR com um *cut-off* mais elevado (80 µg de Hb/g de fezes, equivalente a 400 ng de Hb/mL de tampão no dispositivo OC-SENSOR), resultando numa taxa de positividade de 2,4%, adequada aos recursos locais de colonoscopia. Nos Países Baixos, foi utilizando um *cut-off* mais baixo (15 µg/g [75 ng/mL]), resultando assim numa positividade de 8,4%, mas este foi ajustado para 275 ng/mL (46,25 µg/g) para otimizar os resultados clínicos com os recursos de endoscopia disponíveis. Na Itália, o iFOBT foi adotado em 21 regiões entre 2002 e 2009, mostrando uma redução significativa na mortalidade por CCR para um *cut-off* de 20 µg de Hb/g de fezes (100 ng/mL). O teste imunológico quantitativo, devido à sua maior sensibilidade permite o uso de uma única amostra fecal, melhorando a adesão ao rastreio e os resultados clínicos. Neste contexto, estudos indicam que uma única amostra iFOBT pode ser tão eficaz quanto duas amostras. ⁽¹⁰⁹⁾

Em conclusão, o kit quantitativo FOB Turbilatex® Combo turbidimétrico mostrou maior sensibilidade na deteção de sangue oculto nas fezes em comparação com o kit qualitativo NADAL® FOB cromatográfico. Contudo, seria também importante testar a viabilidade do kit cromatográfico perante um *cut-off* de 40 ng/mL. Os resultados sugerem um potencial maior para o rastreio de doenças gastrointestinais e CCR, embora a confirmação clínica dos diagnósticos seja necessária para validar estes achados. Este estudo contribui para a compreensão das capacidades dos testes iFOBT quantitativos automatizados, mas são necessários mais estudos para confirmar a sua eficácia e aplicabilidade clínica perante o kit NADAL® FOB cromatográfico já utilizado pelo SPC no ULS CHUCB.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

O CCR é uma das principais causas de morte por cancro em Portugal, com cerca de 7.000 novos casos todos os anos, resultando numa média diária de 11 mortes. Esta incidência e mortalidade tem aumentado devido a fatores como o envelhecimento da população, maus hábitos alimentares, tabagismo, sedentarismo e obesidade. Contudo, avanços significativos foram feitos no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento do CCR, como é o caso da cirurgia laparoscópica, resseção de metástases, radioterapia e quimioterapia. Apesar destes progressos, as taxas de cura e sobrevivência a longo prazo permanecem estáveis. Sendo assim, é importante a implementação de programas de rastreio. Métodos de rastreio não invasivos como os testes imunoquímicos fecais (iFOBT), DNA fecal e biomarcadores específicos estão a ser desenvolvidos, com o objetivo de melhorar a qualidade da colonoscopia de rastreio. A deteção precoce e a remoção de pólipos são essenciais para prevenir a progressão do CCR, uma vez que a maioria dos tumores colorretais se desenvolve a partir de pólipos adenomatosos.

Neste projeto, o objetivo principal era comparar a eficácia de dois kits comerciais para a pesquisa de sangue oculto nas fezes, o NADAL® FOB cromatográfico qualitativo e o FOB Turbilatex® Combo turbidimétrico quantitativo por meio de um analisador automático o Architect c8000 da Abbott. Os resultados indicaram que o kit turbidimétrico quantitativo apresentou uma maior sensibilidade na deteção de sangue oculto nas fezes, que foi evidenciado pela maior quantidade de amostras positivas para um *cut-off* de 50 ng/mL. No entanto, devido a impossibilidade de confirmar os diagnósticos clínicos de cada doente cujas amostras foram analisadas, não foi possível um estudo estatístico completo de modo a validar a superioridade clínica do kit FOB Turbilatex® Combo turbidimétrico quantitativo.

Apesar das limitações encontradas durante este projeto os resultados sugerem que o kit FOB Turbilatex® Combo turbidimétrico quantitativo pode ser uma ferramenta mais eficaz para a triagem de doenças gastrointestinais inferiores, proporcionando assim uma deteção precoce de condições como o cancro colorretal. Os resultados são consistentes com a literatura anteriormente mencionada que aponta para uma sensibilidade e especificidade mais elevada dos métodos quantitativos na pesquisa de sangue oculto nas fezes.

De modo a melhorar a aplicabilidade dos resultados obtidos, proponho várias direções para perspetivas futuras deste trabalho. É essencial realizar estudos onde seja possível confirmar os diagnósticos clínicos dos doentes em estudo e a utilização de uma população controlo, permitindo uma validação completa da eficácia dos kits testados, ajudando assim a correlacionar diretamente os resultados dos testes com condições clínicas específicas. Uma maior quantidade de amostragem, de modo a garantir que os resultados são representativos na população da região da Covilhã e Fundão, ajudando a generalizar os achados do estudo. Estudos comparativos adicionais tais como taxa de falsos positivos e falsos negativos é fundamental para avaliar a precisão e a fiabilidade do kit quantitativo.

Uma análise de custo-benefício também seria necessária para determinar a viabilidade económica da implementação em larga escala do kit FOB Turbilatex® Combo, considerando não só o custo do kit mas também os custos associados a tratamentos desnecessários relacionados aos falsos positivos.

Diante do exposto, estudar o impacto da implementação de um teste quantitativo num programa de rastreio populacional permite avaliar a eficácia desse teste na deteção precoce do CCR e outras condições gastrointestinais, influenciando diretamente a taxa de mortalidade. No entanto, serão necessários efetuar mais estudos acerca deste tema, promovendo uma melhoria nos métodos de triagem, com impacto significativo na saúde pública.

Bibliografia

- (1) Página oficial Centro Hospitalar Cova da Beira. Disponível em <https://www.chcbeira.min-saude.pt/apresentacao/historia/hospital-pero-da-covilha/> Acedido a 05/10/2023.
- (2) Henry, J. B. (2012) Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais (Manole, Ed.) 21a edição.
- (3) Página oficial Centro Hospitalar Cova da Beira. Laboratório de Patologia Clínica. Disponível em <https://www.chcbeira.min-saude.pt/servicos-clinicos/meios-complementares-de-diagnostico-e-terapeutica/laboratorio-de-patologia-clinica/> Acedido a 05/10/2023.
- (4) Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Pfaller, M. A. (2020) Medical Microbiology (ELSEVIER, Ed.) 9th ed.
- (5) Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. Current protocols in microbiology, Appendix 3, .
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- (6) Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (2016). Microbiologia-12^a Edição. Artmed Editora.
- (7) Jorge, R. (2004) Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Programa Nacional de Controlo de Infecção. Microbiol.
- (8) Manual de Procedimentos Internos. Laboratório de Microbiologia. CHUCB.
- (9) Bulas dos meios líquidos (BD Biosciences. BBL Cooked Meat Medium. / BD Biosciences. BBL Todd Hewitt Broth. / BD Biosciences. BBL Lowenstein-Jensen Medium.)
- (10) chromID by bioMérieux “Your partner for culture media” . Disponível no laboratório de microbiologia.
- (11) Luiz Rachid Trabulsi, Flavio Alterthum, Lucia, M., Marina Baquerizo Martinez, Leila Carvalho Campos, Olga Fischman Gompertz, & Al, E. (2008). Microbiologia (6th ed.). Atheneu.
- (12) Levinson W. (2010) Microbiologia Médica e Imunologia (Artmed) 10th ed.
- (13) PathoDX™ Strep Grouping Kit. Disponível em <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R62025#/R62025> Acedido a 07/10/2023.
- (14) ETEST®. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/etestr> Acedido a 07/10/2023.
- (15) VITEK® 2 Compact. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-compact> Acedido a 10/10/2023.
- (16) VITEK® 2 ID Cards. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-id-cards> Acedido a 10/10/2023.
- (17) VITEK® 2 AST Cards. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek-2-ast-cards#top> Acedido a 10/10/2023.
- (18) Bula do teste QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus). Disponível no laboratório de microbiologia.
- (19) Bula do equipamento Qvella Fast System. Disponível no laboratório de microbiologia.
- (20) Disponível em <https://www.qvella.com/fast-prep-abc-2/> Acedido a 13/10/2023.

- (21) Tsuchida, S., Umemura, H., & Nakayama, T. (2020). Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(20), 4775. <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>
- (22) MALDI-TOF. Disponível em <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html> Acedido a 07/10/2023.
- (23) Atellica® 1500 Automated Urinalysis System. Disponível em <https://www.siemens-healthineers.com/pt/urinalysis/systems/atellica-1500-automated-urinalysis-system> Acedido a 15/10/2023.
- (24) Programa nacional de controlo de qualidade (PESQUISA DE BACILO ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTE – BAAR).
- (25) Disponível em <https://immuvie.com/products/immuvie-s-pneumoniae-and-legionella/> Acedido a 17/10/2023.
- (26) Disponível em <https://www.certest.es/products/crypto-giardia-3/> Acedido a 20/10/2023.
- (27) Bula do teste StorAX SAF®. Disponível no laboratório de microbiologia.
- (28) Disponível em <https://www.certest.es/products/clostridium-difficile-gdh-ta-tb/> Acedido a 22/10/2023.
- (29) Disponível em <https://www.corisbio.com/products/pylori-strip> Acedido a 22/10/2023.
- (30) Disponível em <https://clinical.r-biopharm.com/products/ridaquick-norovirus-2/> Acedido a 3/11/2023.
- (31) Disponível em <https://www.certest.es/products/rotavirus-adenovirus-3/> Acedido a 3/11/2023.
- (32) Meios de cultura BACT/ALERT®. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-bactalertr> Acedido a 10/11/2023.
- (33) Sistemas de deteção microbiana BACT/ALERT® 3D. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/sistemas-de-detecao-microbiana-bactalertr-3d-visao-general> Acedido a 10/11/2023.
- (34) Cavallazzi, R., & Ramirez, J. A. (2022). How and when to manage respiratory infections out of hospital. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*, 31(166), 220092. <https://doi.org/10.1183/16000617.0092-2022>
- (35) Sistemas Cepheid GeneXpert®. Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/systems/genexpert-family-of-systems.html> Acedido a 11/11/2023.
- (36) Disponível em <https://www.axonlab.com/product/probeax-double-wrapped-10062234> Acedido a 11/11/2023.
- (37) Disponível em <https://www.cepheid.com/en-US/education/knowing-more-matters/pcr-vs-antigen.html> Acedido a 12/11/2023.
- (38) Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/systems/genexpert-family-of-systems/genexpert-system.html#nav-id-3> Acedido a 12/11/2023.
- (39) Xpert® MTB/RIF Ultra. Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/tb-emerging-infectious-diseases/xpert-mtb-rif-ultra.html> Acedido a 20/11/2023.

- (40) Xpert® Carba-R. Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/hai-other-infectious-diseases/xpert-carba-r.html> Acedido a 20/11/2023.
- (41) Xpert® MRSA NxG. Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/hai-other-infectious-diseases/xpert-mrsa-nxg.html> Acedido a 20/11/2023.
- (42) Xpert® CT/NG. Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/blood-virology-womens-health-sexual-health/xpert-ct-ng.html> Acedido a 20/11/2023.
- (43) Bula do teste Xpert® CT/NG. Disponível no laboratório de microbiologia.
- (44) Melo, M., & Silveira, C. (2016). Laboratório de hematologia: teorias, técnicas e atlas (1ª ed.). Rubio.
- (45) Disponível em <https://www.horiba.com/int/medical/products/detail/action/show/Product/yumizen-sps-476/> Acedido a 5/01/2024.
- (46) Disponível em <https://www.horiba.com/bra/medical/products/detail/action/show/Product/yumizen-h2500-h1500-1856/> Acedido a 5/01/2024.
- (47) Bula do Kit May-Grünwald's eosin methylene blue solution modified – SIGMA ALDRICH. Disponível no laboratório de hematologia.
- (48) Bula do Kit HEMATOGNOST Fe® Kit de coloração para detecção de íões ferro 3+ livres em células – SIGMA ALDRICH. Disponível no laboratório de hematologia.
- (49) Procedimentos Internos. Hematologia. CHUCB.
- (50) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. H. (2017). Fundamentos em hematologia de Hoffbrand (7ª ed.). Artmed.
- (51) Disponível em <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/CellImageAnalysis/Pages/CellaVisionDC-1.aspx> Acedido a 10/01/2024.
- (52) Failace, R., & Fernandes, F. (2015). Hemograma: Manual de Interpretação (6a ed.). Artmed.
- (53) Disponível em <https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/blood-sedimentation/sediplus-devices/product/90.1092/> Acedido a 10/01/2024.
- (54) Urrechaga E. (2018). Analytical evaluation of the ADAMS™ A1c HA8180T analyzer for the measurement of HbA1c. *Journal of clinical laboratory analysis*, 32(1), e22155. <https://doi.org/10.1002/jcla.22155>
- (55) Disponível em <https://www.arkray.eu/pt/english/products/diabetes/habalc/ha-8180t.html> Acedido a 15/01/2024.
- (56) Disponível em <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/innovance-pfa-200> Acedido a 15/01/2024.
- (57) Favaloro, E. J., Pasalic, L., & Lippi, G. (2022). Towards 50 years of platelet function analyser (PFA) testing. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 61(5), 851–860. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0666>
- (58) Manual de utilizador do ACL TOP 750. Disponível no laboratório de hematologia.

- (59) Disponível em <https://www.werfen.com/pt/pt-pt/hemostase/familia-acl-top-serie-50>
Acedido a 20/01/2024.
- (60) Disponível em <https://www.werfen.com/pt/pt-pt/hemostase/reagentes-hemosil>
Acedido a 20/01/2024.
- (61) Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/oncology-human-genetics/xpert-fii-fv.html> Acedido a 02/02/2024.
- (62) Bula do teste Xpert® FII & FV (Cepheid®). Disponível no laboratório de hematologia.
- (63) Disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/oncology-human-genetics/xpert-bcr-abl-ultra.html> Acedido a 04/02/2024.
- (64) Bula do teste Xpert® BCR-ABL Ultra (Cepheid®). Disponível no laboratório de hematologia.
- (65) Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B., & Fischer, R. (2023). Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells*, 12(14), 1875. <https://doi.org/10.3390/cells12141875>
- (66) Disponível em <https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/clinical-cell-analyzers/calibur-discontinuation> Acedido a 10/02/2024.
- (67) Procedimentos Internos. Imunoquímica. CHUCB
- (68) Disponível em <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-p-612-lcp1-ins-6062.html> Acedido a 20/03/2024.
- (69) Disponível em <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/instruments/cobas-infinity-central-lab-ins-4113.html> Acedido a 20/03/2024.
- (70) Disponível em <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas-8000-analyzer-series-sys-128.html> Acedido a 20/03/2024.
- (71) Roche Cobas 8000. (Manual de Utilizador). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (72) Disponível em <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-8000-ise-module-ins-2134.html> Acedido a 21/03/2024.
- (73) Roche Cobas 8000. Módulo ISE (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (74) Disponível em <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/instruments/cobas-c-502-ins-2113.html> Acedido a 21/03/2024.
- (75) Roche Cobas 8000. Módulo c 502 (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (76) Disponível em <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/instruments/cobas-e-602-ins-2114.html> Acedido a 25/03/2024.
- (77) Roche Cobas 8000. Modulo e 602 (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (78) Disponível em <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-e-411-ins-502.html#productInfo> Acedido a 27/03/2024.
- (79) Roche Cobas e 411 (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (80) Disponível em <https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/brands/architect/architect-i2000SR.html> Acedido a 03/04/2024.
- (81) Abbott Architect i2000SR (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (82) Disponível em <https://www.siemens-healthineers.com/plasma-protein/systems/atellica-neph-630-system> Acedido a 03/04/2024.

- (83) Atellica® NEPH 630 System (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (84) Disponível em <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/pt/our-solutions/immunocap-allergy-solutions.html> Acedido a 05/04/2024.
- (85) Disponível em <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/our-solutions/phadia-laboratory-systems/phadia-250.html> Acedido a 05/04/2024.
- (86) ImmunoCAP™ 250 (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (87) Disponível em <https://www.sebia.com/pt-pt/technologies/eletroforese-capilar/> Acedido a 17/04/2024.
- (88) Bulas Sebia CAPILLARYS 3 OCTA. Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (89) Disponível em <https://www.sebia.com/pt-pt/instruments/capillarys-3-octa/> Acedido a 17/04/2024.
- (90) Disponível em <https://www.sebia.com/pt-pt/technologies/eletroforese-em-gel/> Acedido a 17/04/2024.
- (91) Sebia HYDRASYS FOCUSING (Bulas). Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (92) Disponível em <https://www.toxicology.abbott/gb/en/screening-devices/surestep-urine-drug-dip-card.html> Acedido a 18/04/2024.
- (93) Bula do teste rápido teste SureStep™ Urine Drug Test Dip. Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (94) Disponível em <https://en.wondfo.com/pt/index20.html> Acedido a 19/04/2024.
- (95) Bula do teste rápido Wondfo One Step hCG. Disponível no laboratório de imunoquímica.
- (96) Deo, S. V. S., Sharma, J., & Kumar, S. (2022). GLOBOCAN 2020 Report on Global Cancer Burden: Challenges and Opportunities for Surgical Oncologists. *Annals of surgical oncology*, 29(11), 6497–6500. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-12151-6>
- (97) Disponível em <https://www.ligacontracancro.pt/educacaoinclusiva-colorretal/> Acedido a 02/03/2024.
- (98) Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- (99) Yu, Y. (2023). Evaluating the Efficacy of Fecal Occult Blood Test and Tumor Marker Combined Screening for Colorectal Cancer. *Proceedings of Anticancer Research*, 7(6), 1-6.
- (100) Simon K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*, 11, 967–976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>
- (101) Disponível em <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-do-colon-e-do-recto/> Acedido a 02/03/2024.
- (102) Jameson, J. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., & Loscalzo, J. (Eds.). (2022). *Harrison's principles of internal medicine (21st ed.)*. McGraw-Hill Education.
- (103) Young, G. P., Symonds, E. L., Allison, J. E., Cole, S. R., Fraser, C. G., Halloran, S. P., Kuipers, E. J., & Seaman, H. E. (2015). Advances in Fecal Occult Blood Tests: the FIT

- revolution. *Digestive diseases and sciences*, 60(3), 609–622.
<https://doi.org/10.1007/s10620-014-3445-3>
- (104) Kościelniak-Merak, B., Radosavljević, B., Zajac, A., & Tomasik, P. J. (2018). Faecal Occult Blood Point-of-Care Tests. *Journal of gastrointestinal cancer*, 49(4), 402–405.
<https://doi.org/10.1007/s12029-018-0169-1>
- (105) Bula do Kit d FOB Turbilatex® Combo (CerTest). Disponível no SPC do CHUCB.
- (106) Hiraoka, S., Takashima, S., Inokuchi, T., Nakarai, A., Takahara, M., Harada, K., Seki, Y., Watanabe, K., Kato, J., & Okada, H. (2019). The novel latex agglutination turbidimetric immunoassay system for simultaneous measurements of calprotectin and hemoglobin in feces. *Intestinal research*, 17(2), 202–209. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.00086>
- (107) Bula do Kit NADAL® FOB (Nal Von Minden). Disponível no laboratório de microbiologia do SPC do CHUCB.
- (108) Marja E. Koivunen, Richard L. Krogsrud, *Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories, Laboratory Medicine, Volume 37, Issue 8, August 2006, Pages 490–497*, <https://doi.org/10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F>
- (109) Benton, S. C., Seaman, H. E., & Halloran, S. P. (2015). Faecal occult blood testing for colorectal cancer screening: the past or the future. *Current gastroenterology reports*, 17(2), 428. <https://doi.org/10.1007/s11894-015-0428-2>
- (110) Abdullah, N., Abd Jalal, N., Ismail, N., Kamaruddin, M. A., Abd Mutalib, N. S., Alias, M. R., Mazlan, L., Sagap, I., & Jamal, R. (2020). Colorectal screening using the immunochemical faecal occult blood test kit among the Malaysian cohort participants. *Cancer epidemiology*, 65, 101656. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.101656>
- (111) Nacional Cancer Institute “Screening Tests to Detect Colorectal Cancer and Polyps”. Disponível em <https://www.cancer.gov/types/colorectal/screening-fact-sheet>
- (112) Rozen, P., Comaneshter, D., Levi, Z., Hazazi, R., Vilkin, A., Maoz, E., Birkenfeld, S., & Niv, Y. (2010). Cumulative evaluation of a quantitative immunochemical fecal occult blood test to determine its optimal clinical use. *Cancer*, 116(9), 2115–2125.
- (113) Brenner, H., & Werner, S. (2017). Selecting a Cut-off for Colorectal Cancer Screening With a Fecal Immunochemical Test. *Clinical and translational gastroenterology*, 8(8), e111. <https://doi.org/10.1038/ctg.2017.37>
- (114) Chiang, T. H., Lee, Y. C., Tu, C. H., Chiu, H. M., & Wu, M. S. (2011). Performance of the immunochemical fecal occult blood test in predicting lesions in the lower gastrointestinal tract. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 183(13), 1474–1481. <https://doi.org/10.1503/cmaj.101248>
- (115) Kovarova, J. T., Zavoral, M., Zima, T., Zak, A., Kocna, P., Kohout, P., Granatova, J., Vanickova, Z., Vranova, J., Suchanek, S., Benes, Z., Celko, M. A., & Povysil, C. (2012). Improvements in colorectal cancer screening programmes - quantitative immunochemical faecal occult blood testing - how to set the cut-off for a particular population. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 156(2), 143–150. <https://doi.org/10.5507/bp.2012.030>

- (116) Njor, S. H., Andersen, B., Friis-Hansen, L., de Haas, N., Linnemann, D., Nørgaard, H., Roikjaer, O., Søndergaard, B., & Rasmussen, M. (2021). The optimal cut-off value in fit-based colorectal cancer screening: An observational study. *Cancer medicine*, 10(5), 1872–1879. <https://doi.org/10.1002/cam4.3761>

Anexos

Parecer nº: 22/2024

Data: 2024/04/11

Assunto: Estudo nº24/2024- "Comparação de métodos em pesquisa de sangue oculto em fezes"

Membros da CE da
ULSCBEIRA:

Prof. Doutor Manuel
Passos Morgado
(Presidente,
Farmacêutico)

Dra. Ana Paula Torgal
Carreira
(Vice-Presidente,
Assistente Social)

Dr. Luís Manuel Ribeiro
(Médico)

Enf. Maria Gabriela
Ramalhinho
(Enfermeira)

Dra. Maria Teresa Bordalo
Santos
(Psicóloga)

Dr. Luís Manuel Carreira
Fiadeiro
(Jurista)

Dr. António Luciano Costa
(Teólogo)

Exmo. Senhor Investigador:
João Tiago Ramos Crucho

A Comissão de Ética da Unidade Local Saúde da Cova da Beira, em reunião realizada em 2024/04/11 deliberou emitir parecer relativamente à realização do Estudo nº24/2024- "Comparação de métodos em pesquisa de sangue oculto em fezes"

Membros da CE da ULSCBEIRA presentes:

Prof. Doutor Manuel Passos Morgado
Dra. Ana Paula Torgal Carreira
Dra. Maria Teresa Bordalo Santos
Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro
Dr. António Luciano Costa

Parecer:

Apreciado o projeto do estudo, foi decidido por unanimidade dos votantes emitir parecer favorável à sua realização.

Este parecer não dispensa eventuais requisitos ou procedimentos por parte do Responsável pelo Acesso à Informação (RAI) ou do Encarregado de Proteção de Dados (EPD) desta instituição, no âmbito do previsto no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados (RGPD) ou noutra legislação aplicável quanto a acesso, tratamento e proteção de dados.

A realização do estudo carece da necessária autorização por parte do Exmo. Conselho de Administração da ULSCBEIRA e no seu decurso pode ser sujeito a auditorias.

O Presidente da Comissão de Ética
Unidade Local Saúde da Cova da Beira


(Prof. Doutor Manuel Passos Morgado)

Considerando, no âmbito do estudo nº 24/2024 “Comparação de métodos em pesquisa de sangue oculto em fezes. Relatório de estágio em Análises Clínicas”:

- Existe todo um processo adjacente a este pedido, que deu entrada no Serviço de Investigação, Epidemiologia e Saúde Pública – Gabinete de Investigação e Inovação, e que obteve os pareceres favoráveis do Coordenador deste Gabinete, do Diretor de Serviço envolvido e da respetiva Comissão de Ética, nos termos da Lei da Investigação Clínica (Lei 21/2014) e do Regulamento e Procedimentos deste Centro de Investigação;
- Os intervenientes no processo estão abrangidos pelo sigilo profissional ou assinaram declaração de confidencialidade;
- Os intervenientes no processo comprometem-se a destruir os dados recolhidos após a conclusão do estudo;
- O interesse público revelado pelo presente estudo.

Assim, verificadas as condições acima descritas e não obstante a impossibilidade de anonimização / pseudoanonimização dos dados autoriza-se, solicitando-se a **Gabinete Planeamento e Controlo de Gestão** que disponibilize a informação dos Adultos assintomáticos ou sintomáticos com ou sem histórico de doenças gastrointestinais num total de 150 amostras para a deteção de sangue oculto nas fezes, ao Dr. Rui Teixeira, Técnico Superior a exercer na ULSCBeira.

Data: 15/04/2024

EPD - Encarregada de Proteção de Dados



RAI – Responsável de Acesso à Informação

Dra. Rosa Ballesteros
responsável pelo Acesso à Informação
CHUCB, E.P.E.

Dados Sociodemográficos: idade, sexo;

Amostra Biológica: recolhidas por rotina;

