



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Quantificação do antígeno do *core* do vírus da hepatite C como método alternativo para o diagnóstico da infeção

**Estágio Curricular no Laboratório de Patologia Clínica no
Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB)**

(Versão final após defesa)

Daniela Filipe Vicente Gonçalves

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

Orientador: Mestre Débora Rodrigues
Coorientador: Professora Doutora Albertina Amaro

Covilhã, julho de 2019

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora mestre Débora Rodrigues por todo o carinho, paciência e compreensão. Por todo o tempo que dedicou a mim e a este projeto, por todos os desafios, por me ensinar a tirar o melhor ao final de cada dia de trabalho e que tudo acontece por uma razão, estou-lhe muito grata.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Albertina Amaro todo o carinho, compreensão e paciência, por estar sempre disponível e por ter embarcado comigo neste projeto. A todos os desafios que me colocou e todo o tempo que me dedicou, muito obrigada.

Agradeço ao Doutor João Casteleiro e à Doutora Conceição Faria a possibilidade de realizar o meu projeto e estágio no Laboratório de Patologia Clínica.

A todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Patologia Clínica, sem exceção, muito obrigada por toda a ajuda e disponibilidade durante todo este ano. Um agradecimento especial à Doutora Andreia Monteiro por toda a ajuda principalmente ao nível da análise estatística.

Agradeço à Doutora Helena Silva e à Abbott pela disponibilização do reagente para a realização deste trabalho, por toda a disponibilidade e ajuda durante este projeto.

Agradeço aos meus pais por todo o apoio, paciência, incentivo e compreensão durante toda a minha vida, em especial durante a minha vida académica. Sem eles alcançar esta etapa não teria sido possível.

Um obrigada especial ao Mauro por toda a compreensão e paciência, por estar sempre disponível para me ouvir e por acreditar em mim.

À Nelita, por todos os conselhos e por estar sempre disponível para mim, muito obrigada.

A toda a minha família e amigos muito obrigada por todo o apoio. Um agradecimento especial à Micas e à Carolina por todos os desabafos e por todo o carinho.

Resumo

A hepatite C é um problema de saúde pública e permanece como a principal causa de doença hepática crônica. O algoritmo de diagnóstico consiste em três testes, determinação de anticorpos do VHC (VHC Ac) para rastreio, detecção do VHC RNA por PCR em tempo real para confirmação e determinação do genótipo viral para iniciar o tratamento. Recentemente, foi desenvolvido um teste para quantificação do antígeno do *core* do VHC (VHC Ag), permitindo o diagnóstico serológico da infecção mais precoce durante a fase aguda. Este teste mostrou ser promissor para diagnosticar a infecção ativa quando comparado aos testes VHC Ac e VHC RNA, devido à sua especificidade e relação custo/benefício.

Todas as 17 amostras negativas para VHC RNA foram negativas para VHC Ag. Em quatro amostras com VHC RNA detetável com baixa carga viral (<15 UI/ml) não foi detetado VHC Ag. Foi determinado o seguinte modelo de regressão linear $[VHC\ Ag] = 0,731 \cdot [VHC\ RNA] - 1,109$. A correlação entre $\log(VHC\ Ag)$ e $\log(VHC\ RNA)$ apresentou um valor de 0,963, permanecendo igualmente forte acima do limiar de 3000 UI/mL ($r = 0,948$). O menor valor de VHC RNA quantificado (20,3 UI/ml) corresponde a um valor de VHC Ag de 5,49 fmol/L. A presença de VHC Ac foi previamente detetada em 43 das 59 amostras e não mostrou ter relevância clínica para o diagnóstico da infecção. Para 16 pacientes, não há informação sobre a sua pesquisa. Tanto o genótipo como o gênero não demonstraram ter influência nos valores de VHC RNA e de VHC Ag.

O teste VHC Ag demonstrou elevada concordância com o teste VHC RNA, apresentando 100% de especificidade e 88,1% de sensibilidade analítica. O teste VHC Ag diminuiu a sua sensibilidade para valores de VHC RNA inferiores a 3000 UI/mL, sendo necessário recorrer à confirmação pelo teste VHC RNA. Os resultados do VHC Ag podem ser emitidos no prazo de 2 a 3 dias vs até 2 semanas para resultados de PCR em tempo real devido à necessidade de amostras em lote por razões de custo-efetividade, permitindo um diagnóstico precoce e o início da terapia. Os dados deste estudo mostram que o teste VHC Ag pode simplificar o diagnóstico e monitorização da infecção pelo VHC.

Palavras-chave

Vírus da hepatite C; Antígeno do *core*; Carga viral; Algoritmo de diagnóstico

Abstract

Hepatitis C is a public health problem as it remains the major cause of chronic liver disease. The diagnostic algorithm consists of three tests, HCV antibody test (HCV Ac) for screening, HCV RNA detection by real-time PCR for confirmation and determination of the viral genotype to initiate the treatment. Recently, a test for quantification of HCV core antigen (HCV Ag) was developed, allowing the serologic diagnostic of infection during acute phase. This test has shown to be promising to diagnose active infection when compared to HCV Ac and HCV RNA since it is specific, less expensive and cost-effective.

All 17 negative HCV RNA samples were negative for HCV Ag. In four HCV RNA positive sample with low viral load (<15 IU/ml) no HCV Ag was detected. The following linear regression model was determined $[HCV\ Ag] = 0,731 \cdot [HCV\ RNA] - 1,109$. The correlation between $\log(HCV\ Ag)$ and $\log(HCV\ RNA)$ yielded a value of 0,963, equally strong above the threshold 3000 IU/mL ($r=0,948$). The lowest HCV RNA quantification (20,3 IU/ml) yielded an HCV Ag quantification of 5.49 fmol/L. HCV Ac previously tested positive in 43 of the 59 samples and was not shown to be clinically relevant for the diagnosis of the infection. For 16 patients there was no information on HCV Ac status. HCV RNA and HCV Ag did not show differences between genotypes or between genders.

The HCV Ag test showed high concordance with RNA, demonstrating 100% specificity and 88,1% of analytical sensibility. The HCV Ag test reduced its sensitivity to HCV RNA values below 3000 IU/mL, and it was necessary to use the HCV RNA test as a confirmatory test. HCV Ag results can be issued within 2-3 days vs up to two weeks for real-time PCR results due to the necessity to batch samples for cost-effectiveness, enabling an earlier diagnosis and initiation of therapy. This study data show that HCV Ag test may be a simple and affordable tool for diagnosis and monitoring of HCV infection.

Keywords

Hepatitis C virus; Core antigen; Viral load; Diagnosis algorithm.

Índice

Capítulo 1: Quantificação do antígeno do <i>core</i> do vírus da hepatite C como método alternativo para o diagnóstico da infeção	19
1. Introdução	19
1.1. Resposta imune	21
1.1.1. Influência do género na resposta imune	22
1.2. Mecanismo e fisiopatologia do vírus	23
1.3. Replicação do VHC	25
1.4. Diagnóstico e monitorização da infeção	26
1.5. Simplificação do algoritmo de diagnóstico	29
2. Material e métodos	32
2.1. Amostra	32
2.2. Desenho do estudo	32
2.2.1. Determinação do anticorpo para o vírus da hepatite C	32
2.2.2. Determinação da carga viral do vírus da hepatite C	32
2.2.3. Determinação do antígeno do <i>core</i> do vírus da hepatite C	33
2.3. Análise estatística	33
3. Resultados	34
3.1. Caracterização da amostra	34
3.1.1. Influência do género nas variáveis VHC RNA e VHC Ag	35
3.1.2. Influência do genótipo nas variáveis VHC RNA e VHC Ag	36
3.2. Correlação e regressão linear entre VHC RNA e VHC Ag	36
3.3. <i>Performance</i> do teste VHC Ag no diagnóstico da infeção	37
3.4. Resultados discordantes entre VHC RNA e VHC Ag	38
4. Discussão	40
5. Conclusão	43
Capítulo 2: Estágio Curricular no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira	45
2.1. Caracterização do Hospital	45
2.2. Caracterização do Laboratório de Patologia Clínica	45
2.3. Imunoquímica	47
2.3.1. Cobas® 6000	48
2.3.2. Cobas® e 411	50
2.3.3. ARCHITECT® i2000 sr	50
2.3.4. Phadia® 250	51
2.3.5. HYDRASIS	52
2.3.6. Técnicas de Biologia Molecular	53

2.3.7. AUTIONMax e sediMax	54
2.3.8. Testes manuais	56
2.4. Hematologia	57
2.4.1. Hematimetria	58
2.4.1.1. Velocidade de sedimentação	60
2.4.1.2. Esfregaço sanguíneo e colorações citoquímicas	61
2.4.2. Hemoglobina glicada	62
2.4.3. Hemostase	64
2.4.3.1. Hemostase primária	65
2.4.3.2. Hemostase secundária	66
2.4.3.3. Fibrinólise	68
2.4.3.4. Estudo molecular	68
2.4.3.5. Fator de von Willebrand	69
2.4.3.6. Anticoagulante lúpico	69
2.4.3.7. Inibidores da coagulação	70
2.4.4. Citometria de fluxo	70
2.5. Microbiologia	71
2.5.1. Meios de cultura	73
2.5.1.1. Técnicas de sementeira	76
2.5.2. Urina	77
2.5.3. Aparelho respiratório	78
2.5.4. Hemoculturas	79
2.5.5. Cateter vascular	80
2.5.6. Fezes	80
2.5.6.1. Coprocultura	80
2.5.6.2. Pesquisa de microrganismos nas fezes	80
2.5.6.3. Exame parasitológico	81
2.5.7. Líquidos biológicos	81
2.5.8. Pus	82
2.5.9. Líquido cefalorraquidiano	83
2.5.10. Biópsia	83
2.5.11. Espermocultura	83
2.5.12. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> metacilina-resistente	85
2.5.13. Pesquisa de <i>Streptococcus agalactie</i>	85
2.5.14. Exame microscópico	85
2.5.14.1. Exame a fresco	86
2.5.14.2. Coloração de Gram	86
2.5.14.3. Coloração de Ziehl-Neelsen	86
2.5.15. Serologia	87
2.5.15.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> no soro	87

2.5.15.2. Pesquisa da bactéria <i>Brucella</i> no soro	88
2.5.15.3. Pesquisa serológica do vírus Epstein-barr	88
2.5.16. Testes preliminares de identificação	88
2.5.16.1. Prova da catalase	88
2.5.16.2. Prova da coagulase	89
2.5.16.3. Teste da oxidase	89
2.5.16.4. Teste de resistência à Novobiocina	90
2.5.16.5. Tipagem de <i>Streptococcus</i> B-hemolíticos	90
2.5.16.6. Teste da Optoquina	90
2.5.16.7. Testes dos fatores V, X e VX	91
2.5.16.8. Teste de hidrólise da ureia	91
2.5.16.9. Pesquisa de β -lactamases (Nitrocefim)	91
2.5.17. Identificação de microrganismos e antibiograma	92
2.5.17.1. Confirmação da resistência à colistina	93
2.6. Medidas de Segurança no Laboratório	93
2.7. Controlo de Qualidade	94
2.7.1. Controlo Interno e Controlo Externo	94
2.7.2. Validação dos resultados	95
Referências bibliográficas	97
Anexo I - Valores de carga viral extrapolados pelo modelo linear	101
Anexo II - Preparação do meio de tetrionato	102

Lista de Figuras

Figura 1 - O vírus da hepatite C e a sua constituição.	23
Figura 2 - Organização do genoma viral do VHC.	24
Figura 3 - Ciclo de replicação do vírus da hepatite C.	26
Figura 4 - Fluxograma do algoritmo de diagnóstico laboratorial e as respetivas conclusões.	27
Figura 5 - Gráfico dos vários períodos em que é possível determinar o RNA, o antigénio do <i>core</i> e o anticorpo do vírus da hepatite C.	29
Figura 6 - Fluxograma do algoritmo laboratorial alternativo e as suas conclusões.	30
Figura 7 - (a) Avaliação da distribuição do genótipo viral na amostra; (b) Avaliação do genótipo viral segundo o género.	35
Figura 8 - Avaliação das variáveis VHC RNA e VHC Ag segundo o género. (a) Distribuição da variável VHC RNA segundo o sexo; (b) Distribuição da variável VHC Ag segundo o sexo.	36
Figura 9 - Avaliação das variáveis VHC RNA e VHC Ag segundo o genótipo. (a) Distribuição da variável VHC RNA segundo o genótipo; (b) Distribuição da variável VHC Ag segundo o genótipo.	36
Figura 10 - Correlação entre os níveis de VHC RNA e VHC Ag. (a) Correlação entre as variáveis englobando todas as amostras; (b) Avaliação da correlação entre as variáveis pelo limiar de VHC RNA > 3000 UI/mL.	37
Figura 11 - Avaliação do comportamento do teste VHC Ag no seguimento da infeção. (a) Avaliação da evolução do paciente A; (b) Avaliação da evolução do paciente B.	38
Figura 12 - Tubos utilizados no laboratório. (a) Tubo de EDTA; (b e c) Tubo de citrato (tampa verde e roxa); (d) Tubo com gel separador; (e) Tubo de heparina-lítio.	46
Figura 13 - Esquema do fluxo de trabalho da secção Imunoquímica.	47
Figura 14 - (a) Equipamento cobas® p612; (b) Mapa de distribuição.	47
Figura 15 - Equipamento cobas® 6000.	48
Figura 16 - Equipamento cobas® e411.	50
Figura 17 - Equipamento ARCHITECT™ i2000sr.	50
Figura 18 - (a) Equipamento Phadia® 250; (b) Esquema do processo do equipamento.	51
Figura 19 - (a) Equipamento ASSIST; (b) Equipamento HYDRASIS.	52
Figura 20 - Equipamento cobas® 4800. (a) Equipamento cobas® x480; (b) Equipamento cobas® z480.	53
Figura 21 - (a) Equipamento <i>MagNA Pure Compact</i> ; (b) Equipamento <i>CFX96™ Real-Time System</i> e <i>C1000™ Thermal Cycle</i> .	54
Figura 22 - Equipamento <i>AUTIONMax</i> e <i>sedimax</i> .	55
Figura 23 - Princípio do teste imunocromatográfico.	56
Figura 24 - Esquema do fluxo de trabalho dos tubos de hemograma.	58

Figura 25 - (a) Equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER; (b) Parâmetros celulares (tamanho vs complexidade) por citometria de fluxo.	60
Figura 26 - (a) Equipamento Sediplus® S 2000 DESAGA; (b) Diferenças entre os 0 e 60 minutos.	61
Figura 27 - (a) Procedimento do esfregaço sanguíneo; (b) Equipamento AEROSPRAY.	61
Figura 28 - (a) Lâmina corada pela coloração de May-Grünwald-Giemsa; (b) Lâmina corada pela coloração de Perls.	62
Figura 29 - (a) Estrutura da molécula de hemoglobina; (b) Estrutura do grupo heme.	63
Figura 30 - (a) Equipamento ADAMS® A1c HA-8180T; (b) Cromatograma.	64
Figura 31 - Processo de hemostase.	65
Figura 32 - Cascata da coagulação.	65
Figura 33 - (a) Equipamento INNOVANCE PFA-200; (b) Princípio do teste da hemostase primária.	66
Figura 34 - Equipamento ACL TOP.	66
Figura 35 - Esquema de avaliação de deficiências na coagulação quando o TTPA se encontra prolongado.	67
Figura 36 - (a) Equipamento GeneXpert®; (b) Esquema da reação de PCR em tempo real.	69
Figura 37 - Classificação morfológica das bactérias.	71
Figura 38 - Constituição da parede celular bacteriana. (a) Parede celular de bactérias Gram-positivo; (b) Parede celular de bactérias Gram-negativo.	72
Figura 39 - Fluxograma do funcionamento da secção de Microbiologia.	73
Figura 40 - Técnica de sementeira para contagem de colónias. (a) Esquema de processamento; (b) Placa inoculada pela técnica de sementeira para contagem de colónias.	76
Figura 41 - Técnica de sementeira por quadrantes. (a) Esquema de processamento; (b) Placa inoculada pela técnica de sementeira por quadrantes.	77
Figura 42 - Esquema de processamento da técnica de sementeira em rede.	77
Figura 43 - Garrafas de hemocultura (a) e interpretação do seu resultado (b).	79
Figura 44 - Galeria para deteção de <i>Mycoplasma</i> e <i>Ureoplasma</i> (Biomerieux®).	84
Figura 45 - Colorações em Microbiologia. (a) Coloração de Gram de uma bactéria Gram-positivo; (b) Coloração de Gram de uma bactéria Gram-negativo; (c) Coloração de Ziehl-Neelsen.	87
Figura 46 - Fluxograma da prova da catalase e da prova da coagulase e interpretação dos seus resultados.	89

Lista de Tabelas

Tabela 1. - Características demográficas e virais da população em estudo.	34
Tabela 2. - Resultados dos parâmetros analíticos envolvidos no diagnóstico laboratorial da hepatite C e comparação com o método de referência (VHC RNA).	35
Tabela 3. - Avaliação da <i>performance</i> do teste VHC Ag no diagnóstico laboratorial de dois pacientes.	38
Tabela 4. - Resumo dos dados discordantes entre as variáveis VHC RNA e VHC Ag.	39
Tabela 5. - Parâmetros biológicos determinados no equipamento cobas®6000.	48
Tabela 6. - Princípio de reação da tira <i>Uriflet 5</i> .	55
Tabela 7. - Células sanguíneas.	58
Tabela 8. - Parâmetros do eritrograma.	59
Tabela 9. - Parâmetros do leucograma.	60
Tabela 10. - Parâmetros do plaquetograma.	60
Tabela 11. - Coloração de May-Grünwald-Giemsa.	62
Tabela 12. - Hemoglobinas mais frequentes no sangue.	63
Tabela 13. - Técnicas utilizadas para a determinação dos parâmetros no equipamento ACL TOP.	67
Tabela 14. - Métodos de determinação específicos dos fatores da coagulação.	68
Tabela 15. - Classificação das bactérias tendo em conta a fonte de carbono e de oxigênio.	73
Tabela 16. - Meios de cultura sólidos.	74
Tabela 17. - Interpretação dos resultados da pesquisa de B-lactamases.	92

Lista de Acrónimos

ADP	Adenosina difosfafo
AL	Anticoagulante lúpico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Antitrombina
ATP	Adenosina trifosfato
β-hCG	Fração beta da hormona gonadotrofina coriónica humana
CA	Antigénio do carcinoma
cDNA	DNA complementar
CEA	Antigénio do carcinoma embrionário
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira
CLIA	Quimioluminescência
CMV	Citomegalovírus
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAA	Antiviral de ação direta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECLIA	Eletroquimioluminescência
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EliA	Imunoensaio fluroenzimático em <i>sandwich</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
fmol	Femtomoles (10^{-15})
FvW	Fator de von Willebrand
FvW:Ag	Antigénio do Fator de von Willebrand
GGT	Gamaglutamiltransferase
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA1c	Hemoglobina glicada
HbF	Hemoglobina fetal
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta <i>performance</i>
Ht	Hematócrito
Ig	Imunoglobulina
IFA	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferão
INR	Rácio Internacional Normalizado
IRF	<i>Immature reticulocyte fraction</i>
ISE	Eléctrodo seletivo a iões
kb	Kilobases
LCR	Líquido cefalorraquidiano

LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPC	Laboratório de Patologia Clínica
MIC	Concentração inibitória mínima
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metacilina-resistente
MRSM	Meio para pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> metacilina-resistente
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina no estado oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina no estado reduzido
nm	Nanómetros (10^{-9})
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Proteína C
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDW	Dispersão do volume plaquetar
peg-IFN	Interferão pegilado
PLT	Plaquetas
proBNP	Pré-Péptido Natriurético do tipo B
PS	Proteína S livre
PSA	Antigénio específico prostático
PVL	Toxina leucocidina de Panton-Valentine
R:CoF	Cofator ristocetina do FvW
RDW	Dispersão do volume eritrocitário
RET	Reticulócitos
RLU	Unidades relativas de luz
RNA	Ácido ribonucleico
RNases	Ribonuclease
RVM	Volume reticulocitário médio
SVR	Resposta virológica sustentada
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
Tg	Tireoglobulina
TP	Tempo de protrombina
TPO	Tireoperoxidase
TSH	Hormona estimulante da tiroide
TT	Tempo de trombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UFC	Unidades formadoras de colónias
UWBC	Contagem de Leucócitos Corrigida
VCM	Volume corpuscular médio
VHC	Vírus da hepatite C
VHC Ac	Anticorpo do vírus da hepatite C
VHC Ag	Antigénio do vírus da hepatite C
VHC RNA	RNA do vírus da hepatite C
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
VPM	Volume plaquetar médio
VS	Volume de sedimentação
WBC	Contagem de Leucócitos

Capítulo 1: Quantificação do antígeno do *core* do vírus da hepatite C como método alternativo para o diagnóstico da infecção

1. Introdução

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (VHC), um vírus de RNA da família *Flaviviridae* descoberto em 1989, e que continua a infetar milhões de pessoas em todo o mundo, estimando-se que cerca de 71 milhões de pessoas estejam infetadas¹⁻⁴. Anteriormente a 1989 o diagnóstico da hepatite C era realizado por exclusão e a infecção era denominada como “hepatite não-A não-B”³. A hepatite C permanece atualmente como a causa mais prevalente de doença hepática, sobretudo da doença hepática crónica. As manifestações de lesão hepática evidenciadas nesta infecção podem ser mudanças histológicas mínimas, fibrose extensa, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC), que em última instância podem conduzir à morte¹. A infecção encontra-se também associada a manifestações extra-hepáticas, entre as quais crioglobulinémia, aumento da resistência à insulina, diabetes, aterosclerose, fadiga e comprometimento cognitivo^{5,6}. A maioria das infecções relatadas são assintomáticas e como consequência grande parte dos indivíduos infetados não tem conhecimento de que são portadores do vírus. Este facto permanece a maior barreira à erradicação da doença, uma vez que as manifestações associadas à infecção são, geralmente, detetadas numa fase avançada⁵. A Organização Mundial de Saúde (OMS) instaurou o objetivo de identificar o maior número possível de casos de hepatite C e de curar cerca de 90% das infecções até 2030, com o objetivo final de erradicar a infecção¹.

O vírus da hepatite C é transmitido maioritariamente por exposição cutânea a sangue infetado, através de procedimentos médicos ou da partilha de dispositivos contaminados para uso de drogas. A transmissão vertical (de mãe para filho) e a transmissão sexual podem ocorrer, contudo são vias de transmissão menos frequentes, exceto no caso de indivíduos do sexo masculino infetados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) que tenham relações desprotegidas com outros indivíduos do mesmo sexo⁵. A transmissão vertical é menos frequente devido à placenta funcionar como uma barreira imunoprotetora, oferecendo resistência ao vírus e diminuindo a sua transmissão⁷. O vírus também pode ser transmitido aquando transfusões sanguíneas, administração de fatores de coagulação, e realização de tatuagens e de *piercings* corporais em estabelecimentos cuja atividade não se encontre regularizada nem cumpram as condições de higiene mínimas recomendadas⁵.

A população definida por apresentar elevado risco de infecção por VHC inclui: utilizadores frequentes de drogas injetáveis; indivíduos que receberam transfusões de sangue, plasma ou dos seus componentes e os que receberam transplantes de órgãos que foram realizados antes de 1990 (data em que foi possível desenvolver testes específicos para diagnosticar a hepatite C) ou cujos dados foram diagnosticados com VHC; indivíduos em hemodiálise; indivíduos que tenham sido submetidos a intervenções cirúrgicas anteriores a 1990; indivíduos infetados com VIH; profissionais da área da saúde que sejam expostos a amostras de sangue infetado com VHC; filhos de mães infetadas com VHC; indivíduos com múltiplos parceiros sexuais e homens que tenham relações sexuais com homens^{3,5,8}. Todos os indivíduos incluídos nesta população que tenham valores de alanina aminotransferase (ALT) persistentemente anormais e os indivíduos que nasceram entre 1945 e 1965, devido à elevada prevalência de anticorpos anti-VHC, devem ser testados para a infecção por VHC^{1,8,9}.

A hepatite C é diagnosticada laboratorialmente por um algoritmo constituído por três testes diferentes: determinação de anticorpos anti-VHC, pesquisa e quantificação do RNA viral e determinação do genótipo viral^{1,5,10}. A infecção pelo vírus da hepatite C pode ser caracterizada em duas fases: a fase aguda e a fase crónica. A fase de infecção aguda está associada ao período inicial da infecção e caracteriza-se pela presença de RNA viral e pela ausência de anticorpos contra o vírus (anticorpo anti-VHC). A maioria dos casos de infecção aguda ocorre sem sintomas e sem sinais clínicos associados à doença. Uma minoria dos pacientes com infecção aguda desenvolve icterícia, fadiga, dor abdominal no quadrante superior direito, desconforto ou artralgia (dor nas articulações). A maioria das infeções agudas evoluem para infeções crónicas, podendo ainda progredir para as consequências associadas a esta fase como fibrose, cirrose e HCC⁵. Cerca de 15-50 % dos indivíduos infetados eliminam espontaneamente o vírus nos primeiros 2-6 meses após o contacto; estes pacientes desenvolvem anticorpos anti-VHC, que permanecem para toda a vida¹¹.

A infecção crónica caracteriza-se por sintomas como dores musculares, ascite, hemorragias gastrointestinais, síndrome hepatorenal e encefalopatia hepática, para além dos sintomas mencionados na infecção aguda; contudo, o sintoma mais comum é a fadiga. A infecção crónica está associada a estados de fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular⁵. Muitos pacientes com infecção crónica podem permanecer assintomáticos durante vários anos e apenas são diagnosticados quando desenvolvem cirrose hepática. A progressão para estes estadios da doença tem como fatores o tempo de infecção e a idade em que foi contraída a infecção inicial^{5,10}. Os indivíduos com infecção crónica têm mais predisposição para desenvolver resistência à insulina e diabetes *mellitus*, que poderão levar ao aumento da mortalidade cardiovascular^{5,6}.

A progressão natural da infecção resulta da interação entre o vírus (agente infeccioso) e o sistema imune do hospedeiro. O nível de replicação viral não é um fator preditivo do curso natural da infecção mas é um parâmetro preditivo da resposta ao tratamento. A progressão da infecção não é um processo linear e pode ser acelerado por diversos fatores, como a idade do paciente, ser do sexo masculino, o consumo de álcool e a coinfeção com outros vírus, como

o vírus da hepatite B e o VIH^{1,5}. A coinfeção com hepatite B e o consumo excessivo de álcool são impulsionadores para aumentar a progressão da falência hepática¹. Os genótipos e subgenótipos virais têm influência na progressão da infeção e na resposta ao tratamento^{1,5}.

No ano 2011 foram aprovados em Portugal dois fármacos pertencentes à classe dos antivirais de ação direta (DAA) para o tratamento da hepatite C. Após esta aprovação, encontram-se disponíveis duas estratégias terapêuticas para o tratamento da hepatite C. O tratamento pode ser realizado com interferão pegilado (peg-IFN) e ribavirina (terapia combinada) ou com DAA. Até ao ano de 2014 a terapêutica utilizada foi peg-IFN combinado com ribavirina, sendo necessário determinar o genótipo e o subgenótipo viral para definir a dose diária e o tempo de tratamento². Após 2014 iniciou-se a terapêutica com DAA, sendo esta pangenotípica, isto é, não necessita de determinação prévia do genótipo para definição do esquema terapêutico; estes fármacos são dirigidos para as proteínas virais constituídas por sequências conservadas presentes em todos os genótipos^{2,3}. Os DAA têm demonstrado maior segurança e tolerância para o paciente e maiores curvas de cura comparativamente à terapêutica anterior. Contudo, estes fármacos são dispendiosos, o que limita o acesso da população ao tratamento⁸. O objetivo da terapêutica é atingir a resposta virológica sustentada (SVR) para definir a cura da infeção. Define-se como infeção curada/resolvida quando o RNA viral (VHC RNA) não é detetado às 12 ou 24 semanas após o final do tratamento, correspondendo a uma resposta virológica sustentada¹.

Apesar de já terem sido desenvolvidos fármacos para o tratamento eficaz desta doença, ainda não foi possível o desenvolvimento de uma vacina⁵. A vacina é crucial para diminuir os casos de hepatite C; contudo, o seu desenvolvimento tem barreiras difíceis de ultrapassar. A maior barreira é o modelo animal que melhor representa o ser humano. O modelo mais adequado é o chimpanzé, cuja utilização tem uso limitado por ser um animal em via de extinção, o que levanta inúmeros problemas éticos e representa um custo elevado. Apesar de existirem outros animais disponíveis (como o rato quimérico), nenhum tem a capacidade de substituir adequadamente o ser humano e a sua resposta imunológica à vacina desenvolvida³. A infeção por VHC é, em alguns países, caso de ponderação para um transplante hepático⁵.

1.1. Resposta imune

No processo de “clearance” viral do VHC é necessário que ocorra interação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa que determinará a resolução ou a persistência da infeção; no entanto, este conceito ainda não está totalmente esclarecido⁵. Na resposta imune viral é de destacar as células *natural killer* (NK), os anticorpos humorais e as células T, presentes em ambas as fases da infeção^{5,12,13}.

Nos primeiros dias após a infeção ocorre um aumento exponencial da carga viral que estabiliza nas semanas seguintes. Em resposta ao aumento de carga viral é produzido interferão; contudo, esta resposta não é completamente eficaz para a eliminação viral¹². Devido à elevada heterogeneidade e variabilidade genética do VHC a maioria dos anticorpos

humorais não parece ter uma função protetora relevante uma vez que têm baixa atividade antiviral. Contudo, a utilização de anticorpos neutralizadores, dirigidos contra epítomos virais é uma possível medida preventiva associada ao controlo da infeção. A utilização de anticorpos neutralizadores tem demonstrado, em diversos estudos, ser mais eficiente na fase aguda da infeção, período em que é mais provável ocorrer a “clearance” viral espontânea^{5,12}.

A resposta das células T (CD4+ e CD8+) é ampla e multiespecífica. Na fase aguda da infeção verifica-se uma diminuição do número de células T e da proporção das suas subpopulações, associada à persistência da infeção e à progressão para o estado crónico⁵. A perda abrupta das células em circulação é sugestiva de um processo de apoptose precoce e da perda do controlo imune da infeção. Tem sido sugerido que o VHC tem a capacidade de induzir a diferenciação das células T noutros subtipos celulares que irão influenciar o curso da infeção. Na fase crónica da infeção as células NK e as células T encontram-se fenotipicamente e funcionalmente alteradas¹³. As células T alteradas infiltram-se nos hepatócitos de modo disfuncional e o mecanismo de apoptose programado encontra-se desregulado⁵. A perda precoce das células T CD4+ resulta na exaustão celular das células T CD8+, que participam no mecanismo de controlo de escape imune viral; como consequência, ocorre a emergência das variantes virais que têm capacidade de resistir ao mecanismo de controlo do escape imune¹².

O VHC está associado a estratégias de escape imune e à adaptação do vírus em células infetadas; estas duas características culminam na persistência da infeção⁵. A proteína NS3/4A tem a propriedade de inativar vias de sinalização imunes do hospedeiro, que reagem quando o vírus é detetado pelo sistema imunitário¹⁴. Uma das vias envolvidas é a via do interferão (IFN); o IFN é uma citocina responsável por ativar e regular componentes da imunidade inata como as células NK, induzindo um “estado antiviral”. O IFN é produzido por células infetadas, macrófagos e células dendríticas (células do sistema imune inato); no entanto, a indução endógena do IFN no fígado aparenta ter pouca eficácia antiviral¹². Esta associação pode ser uma das causas para as baixas curvas de resposta ao tratamento baseado em peg-IFN e ribavirina⁵.

1.1.1. Influência do género na resposta imune

Existem diferenças na intensidade (valor da carga viral), prevalência (número de indivíduos infetados) e na patogenicidade das infeções virais entre os géneros. O sexo masculino caracteriza-se por ser o género com maior intensidade e maior prevalência de infeções virais. Por outro lado, o sexo feminino caracteriza-se por ser o género com resposta imune mais forte, característica essencial para eliminar espontaneamente o vírus e para reduzir a suscetibilidade de contrair infeções virais. A diferença entre os géneros é também verificada na farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção do medicamento) e na farmacodinâmica (efeito do fármaco nos processos fisiológicos e bioquímicos)¹⁵.

A entrada do vírus nos hepatócitos ocorre através de recetores de reconhecimento padrão, sendo este mecanismo diferente entre os géneros. O sexo feminino apresenta uma

resposta imune, humoral e celular superior ao sexo masculino perante a estimulação antigénica, vacinação e infeção. Esta diferença imunológica entre géneros parece estar relacionada com os esteróides sexuais, como a testosterona, o estradiol e a progesterona, que têm influência na imunidade celular. Muitos dos genes relacionados com a resposta imune encontram-se codificados no cromossoma X, podendo justificar esta diferença¹⁵. Estas diferenças entre géneros são atenuadas quando as mulheres se encontram na menopausa, devido à diminuição dos níveis de estradiol; a hipótese proposta é que o estradiol inibe a libertação das partículas virais para a circulação. Neste período é possível verificar maior progressão e manifestações da doença (como fibrose ou cirrose) no sexo feminino, com possibilidade de atenuação ou reversão das mesmas com o uso de terapêutica hormonal de substituição^{15,16}. Em casos de terapia combinada (peg-IFN e ribavirina) foram observadas diferenças na resposta terapêutica entre os géneros, que são atenuadas quando as mulheres se encontram no período pós-menopausa¹⁵.

O sexo feminino está mais predisposto à eliminação espontânea do VHC enquanto que o sexo masculino tem maior risco de desenvolver cirrose. Em idade fértil, o sexo feminino exhibe reações mais adversas à terapia combinada, como anemia, perda de peso, náuseas, perda de visão, redução da função tiroideia e outras coinfeções, estando mais predisposto ao ajuste da dose terapêutica e à interrupção do tratamento. A resposta virológica sustentada é superior nas mulheres relativamente aos homens. As mulheres no período pós-menopausa apresentam concentrações mais elevadas de citocinas pró-inflamatórias, que leva a maior inflamação do fígado e fibrose, quando comparadas com mulheres no estado de pré-menopausa. Estas evidências podem justificar a diminuição da eficácia antiviral verificado na menopausa¹⁵.

1.2. Mecanismo e fisiopatologia do vírus

O vírus da hepatite C pertence à família *Flaviviridae* e ao género *Hepacivirus*. Os seus viriões têm cerca de 45-65 nm de diâmetro e possuem um invólucro constituído por uma bicamada lipídica onde se encontram incorporadas duas glicoproteínas (E1 e E2) envolvidas no processo de infeção dos hepatócitos (Figura 1). Este invólucro envolve a nucleocápside não-icosaédrica que é composta por várias cópias da proteína do *core* do vírus e contém a cadeia de RNA viral, constituindo um genoma com aproximadamente 9,6 kb. A cadeia de RNA genómica é codificada numa poliproteína com aproximadamente 3000 aminoácidos⁵.

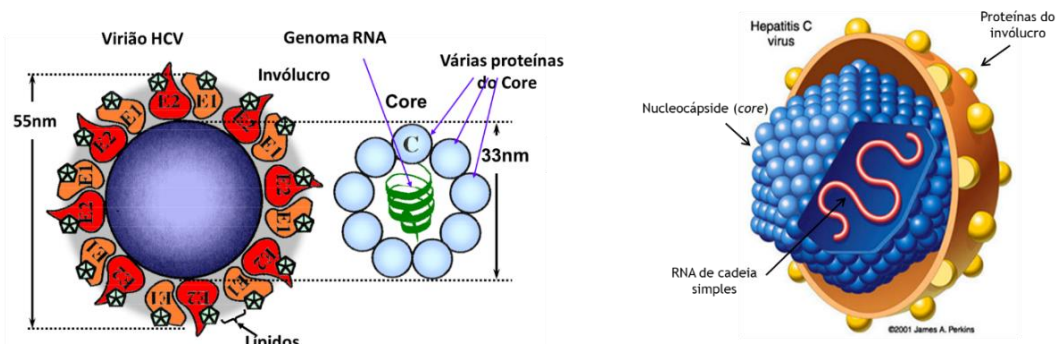


Figura 1. O vírus da hepatite C e a sua constituição (Abbott Laboratories).

A cadeia de RNA viral codifica várias proteínas que podem ser classificadas em dois grupos: as proteínas estruturais, que formam um invólucro funcional e estão envolvidas no processo de infecção dos hepatócitos, e as proteínas não-estruturais, que constituem o complexo replicase, necessário para a replicação e propagação viral (Figura 2). As proteínas estruturais (*core*, E1 e E2) estão codificadas na região amino-terminal (N-terminal) da cadeia simples de RNA, enquanto que a restante cadeia codifica as proteínas não-estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B)¹⁷. Os viriões do VHC associam-se a lipoproteínas de baixa densidade (LDL e VLDL) para formar lipopartículas virais que podem conter apolipoproteína B e outras apolipoproteínas como apolipoproteína C e apolipoproteína E⁵.

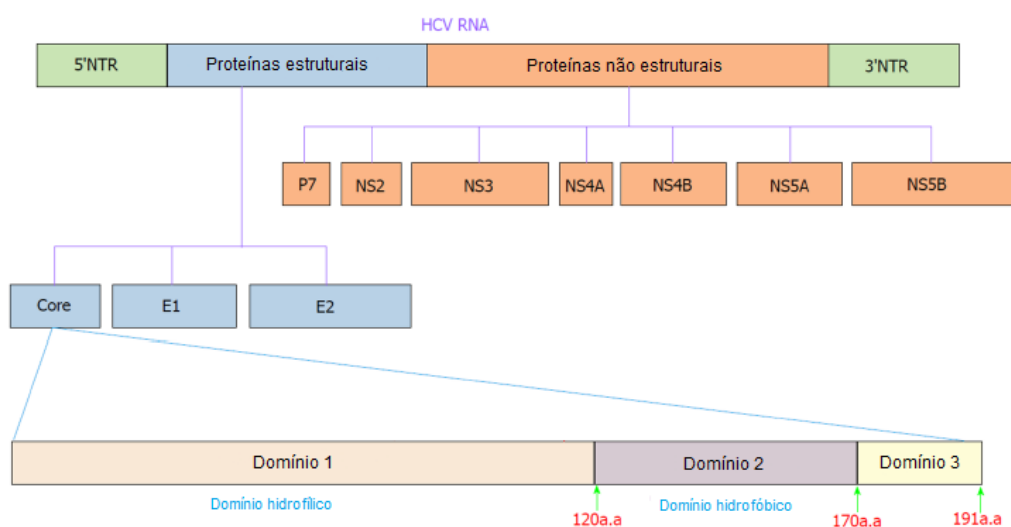


Figura 2. Organização do genoma viral do VHC (adaptado de *Mahmoudvand S. et al., 2019*)¹⁷.

O VHC é um vírus heterogéneo, tendo sido identificados, através da análise filogenética do vírus, 6 a 7 genótipos virais divididos em vários subgenótipos. O genótipo viral influencia o curso da infecção e a resposta à terapêutica antiviral. O genótipo 3 está associado a uma infecção mais agressiva, enquanto que o genótipo 1a está associado a curvas de resposta terapêutica mais baixas, mesmo com DAA⁵.

A infecção por VHC pode estar muitas vezes associada a lesões e disfunção hepáticas como fibrose e cirrose. A fibrogénese é caracterizada pela ativação das células estreladas (ou perissinusoidais) hepáticas em miofibroblastos; estes produzem uma matriz extracelular fibrosa em excesso que provoca lesão no fígado. A fibrogénese é uma das complicações associadas à infecção crónica, origina fibrose hepática progressiva e, em última instância, leva ao desenvolvimento de cirrose. O próprio vírus da hepatite C participa no processo de fibrogénese devido às interações intracelulares entre as proteínas virais e as proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, como as proteínas envolvidas nos pontos de controlo da replicação do DNA e do ciclo celular. A infecção crónica está associada a inflamação hepática arrastada no tempo devido ao *stress* oxidativo e à resposta imune dirigida contra os hepatócitos infetados que expressam os epítomos virais. Os hepatócitos infetados produzem fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que estão envolvidos no recrutamento das

células do sistema imunitário, na ação contínua destas no local da infecção e na ativação contínua dos miofibroblastos⁵.

A cirrose é um fator determinante para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, uma vez que este estadio é pouco frequente em pacientes que não tenham desenvolvido cirrose previamente⁵. O VHC tem a capacidade de inibir vias moleculares envolvidas no controlo do ciclo celular. Consequentemente, os hepatócitos infetados sofrem várias transformações celulares como o aumento da sua proliferação e a expressão de recetores diferentes dos inicialmente expressos. A associação de danos e de mutações no DNA resultantes do controlo ineficaz do ciclo celular, o *stress* oxidativo associado à infecção crónica e o aumento da proliferação dos hepatócitos são fatores impulsionadores para que os hepatócitos sofram transformação oncogénica podendo originar um cancro (HCC)^{18,19}.

1.3. Replicação do VHC

A replicação do VHC envolve as duas glicoproteínas presentes no invólucro, E1 e E2, as lipoproteínas presentes na superfície das lipopartículas virais e as moléculas presentes na superfície do hepatócito, como os glicosaminoglicanos e os recetores de LDL. O complexo de recetores do VHC aparenta estar associado às junções estreitas entre os hepatócitos, o que permite a transmissão direta do vírus célula a célula. Após a formação dos novos vírus, estes infetam os hepatócitos por endocitose mediada por clatrina. Seguidamente ocorre a fusão entre a membrana viral e a membrana endossomal e a libertação da nucleocápside viral no citoplasma⁵. A glicoproteína E1 é indicada como a glicoproteína que facilita a fusão celular do vírus e a glicoproteína E2 é constituída por duas regiões hipervariáveis envolvidas na neutralização da resposta imune^{3,5}.

Após a libertação da nucleocápside ocorre a libertação da cadeia de RNA genómica no citoplasma do hepatócito. A cadeia de RNA funciona como mRNA que, após tradução no ribossoma, sintetiza a poliproteína do VHC. A região 5' terminal da cadeia controla a abertura da cadeia de RNA e a sua translação. O precursor da poliproteína é traduzido na membrana do retículo endoplasmático e resulta na formação de três proteínas estruturais e de sete proteínas não-estruturais. São necessárias pelo menos duas peptidases celulares para processar as proteínas estruturais do VHC. As duas peptidases virais (NS2 e NS3/4A) são necessárias para o processamento das proteínas não-estruturais. As proteínas virais permanecem associadas às membranas intracelulares do retículo endoplasmático após o seu processamento⁵.

A cadeia de RNA genómica (positiva) serve como molde para a síntese de uma cadeia de RNA negativa, uma cadeia intermediária da replicação, que funciona como cadeia molde para sintetizar várias cópias de cadeias de RNA positivas. Estas novas cadeias de RNA são traduzidas em proteínas que podem formar novos intermediários do ciclo de replicação ou podem ser armazenadas e formar novas partículas virais. A formação da partícula viral é iniciada no citoplasma quando a proteína do *core* e a proteína NS5A interagem com a cadeia de RNA genómica⁵.

O ciclo de replicação do VHC (Figura 3) depende de alguns fatores presentes nas células hospedeiras tais como a ciclofilina A, que interage com as proteínas NS5A e NS5B e induz mudanças conformacionais para uma replicação viral eficiente; o microRNA-122, que tem a capacidade de se ligar a duas regiões conservadas do ribossoma e participa na estabilização das cadeias de RNA para que a replicação viral seja eficiente⁵.

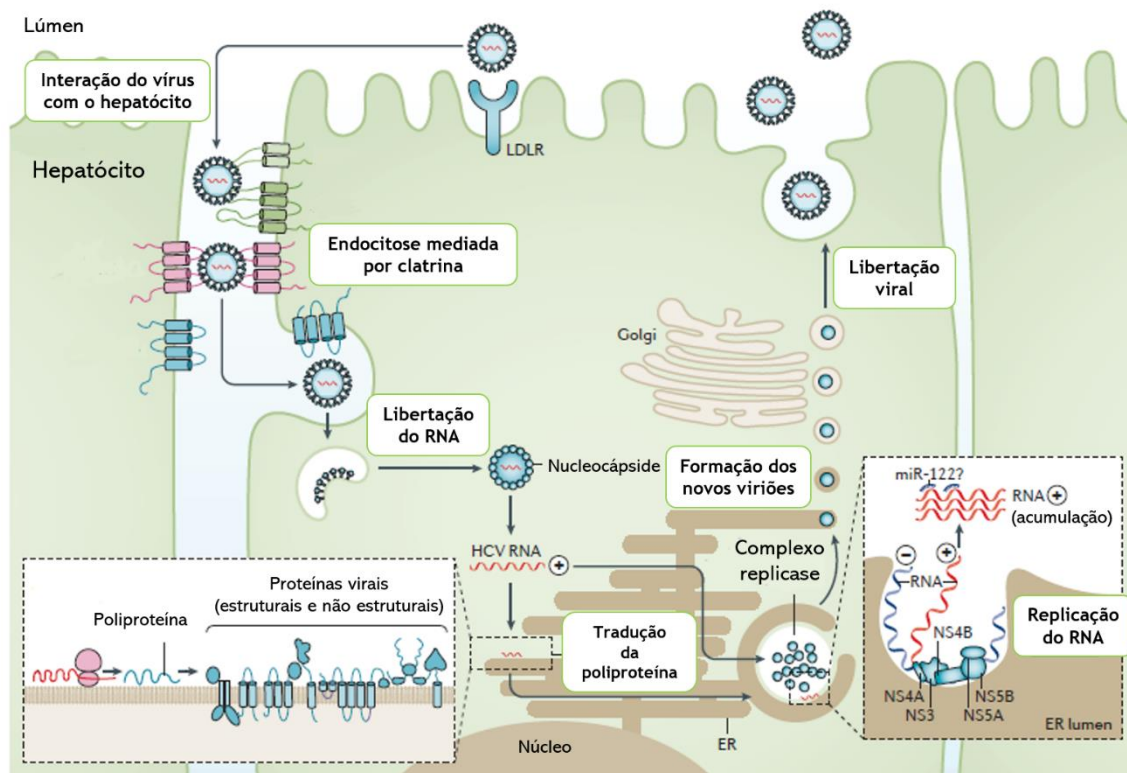


Figura 3. Ciclo de replicação do vírus da hepatite C (adaptado com permissão de Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature Reviews Disease Primers Hepatitis C virus infection, Manns M.P., Buti M., Gane E., Pawlotsky J-M., Razavi H. et al., 2017)⁵. ER: retículo endoplasmático; LDLR: recetor de LDL; miR-122: microRNA-122.

1.4. Diagnóstico e monitorização da infeção

O diagnóstico da hepatite C baseia-se sobretudo em testes laboratoriais, mas pode ser acompanhado por outros meios complementares de diagnóstico como ecografias (por exemplo o *Fibroscan*) e biópsias para um correto diagnóstico e monitorização. Por ser uma infeção maioritariamente assintomática e os sintomas associados não serem específicos, a investigação laboratorial da infeção é realizada quando se verificam alterações nos parâmetros da função hepática relacionados, eventualmente, a algum comportamento de risco, ou quando se verifica um comportamento de risco por parte do paciente. O diagnóstico laboratorial da infeção por VHC rege-se pelo seguinte algoritmo: deteção do anticorpo anti-VHC (teste VHC Ac) por ensaio imunoenzimático de terceira geração; deteção e quantificação da carga viral (teste VHC RNA) por PCR em tempo real ou amplificação mediada por transcrição; e determinação do genótipo e subgenótipo viral por sequenciação. Pode ainda ser utilizado outro teste, a deteção do antigénio do *core* do VHC (teste VHC Ag) por ensaio imunoenzimático. Este teste pode ser utilizado em alternativa ao teste VHC RNA; no entanto,

apesar de estar indicado nas *guidelines* internacionais, este teste não é muito utilizado na prática clínica. Este algoritmo deve ser aplicado a todos os pacientes com níveis elevados de enzimas hepáticas, como a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) e de outras enzimas indicativas de lesão hepática ou morte de células hepáticas, a dadores de sangue e a todos os indivíduos que se enquadrem nos grupos de risco^{1,3,5,8}.

O teste VHC Ac é atualmente utilizado como teste de primeira linha para rastreio da população ou quando existe uma suspeita de contacto com o vírus. No caso de não ter ocorrido uma exposição prévia, perante uma supressão imune ou no período de seroconversão, o resultado do teste VHC Ac é negativo e indica ausência de infeção ou de produção de anticorpos. Perante um resultado positivo é necessário recorrer a um teste confirmatório, uma vez que o VHC Ac não discrimina uma infeção ativa de uma infeção antiga. O teste VHC RNA é utilizado como teste confirmatório do teste VHC Ac quando este é positivo e é considerado o ensaio de referência para confirmar a infeção ativa. Perante um resultado positivo para o teste VHC RNA, procede-se à determinação do genótipo viral para definição do esquema terapêutico e da sua duração. No caso de apenas ser detetado VHC RNA, o teste de VHC Ac deve ser repetido nas semanas seguintes (Figura 4)^{3,5}. Estes ensaios laboratoriais são utilizados não só para diagnóstico, mas também para monitorização do tratamento. A monitorização é realizada por sucessivas determinações de VHC RNA durante e após a terapia. No caso de esquemas terapêuticos que utilizem IFN-peg e ribavirina, a determinação do VHC RNA é realizada antes do paciente iniciar o tratamento, na segunda e quarta semanas de tratamento e 12, 24 ou 48 semanas após o fim do tratamento¹.

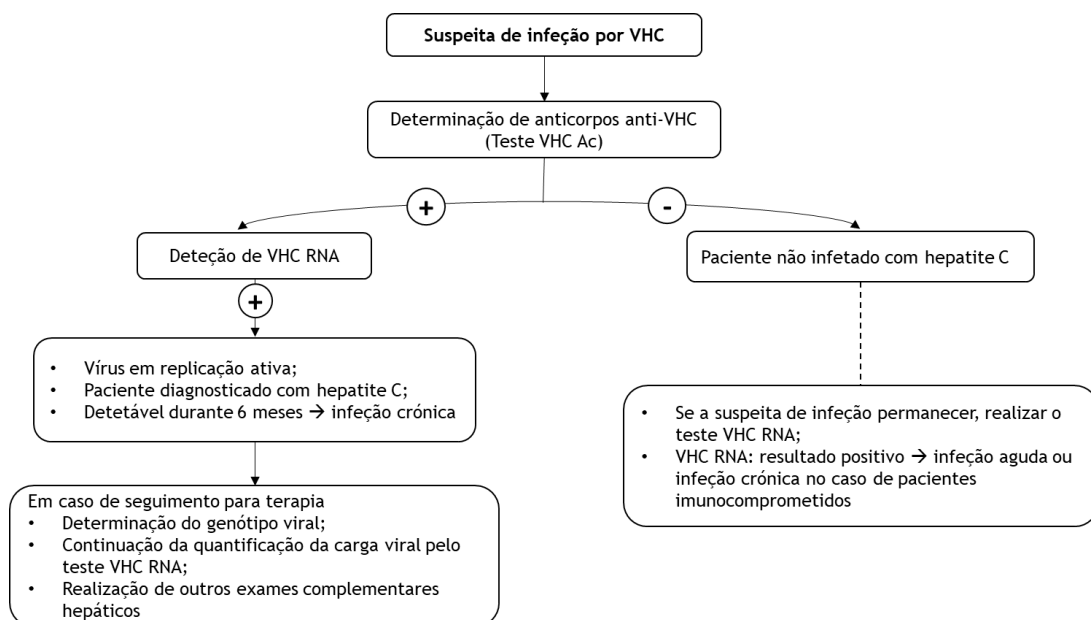


Figura 4. Fluxograma do algoritmo de diagnóstico laboratorial e as respetivas conclusões (adaptado de Manns M.P. et al., 2017)⁵.

A utilização deste algoritmo pode terminar em três possíveis conclusões: infeção ativa (aguda ou crónica), infeção antiga ou infeção não detetada. A infeção ativa caracteriza-se

pela detecção de VHC RNA. A infecção aguda caracteriza-se por ser o período inicial da infecção, período no qual ocorre a seroconversão dos anticorpos e ocorre um aumento exponencial da carga viral. Nesta fase é bastante frequente detetar a presença de anticorpos anti-VHC e de VHC RNA, ou apenas a presença de VHC RNA. A infecção crónica é definida como a detecção persistente de VHC RNA 6 meses após a infecção aguda¹. Este período é caracterizado pela presença simultânea de VHC RNA (ou VHC Ag) e de VHC Ac. No caso de apenas ser positivo o teste VHC Ac estamos perante uma infecção antiga na qual o paciente já eliminou o vírus, espontaneamente ou após terapia antiviral^{1,3}.

A monitorização da infecção ou do tratamento para definir a SVR pode ser realizada com o teste VHC RNA ou com o teste VHC Ag às 12 ou 24 semanas após o final do tratamento^{1,2}.

O teste **VHC Ac** deteta anticorpos anti-VHC produzidos pelo hospedeiro em resposta ao contacto com o vírus; este teste pode ser realizado em soro ou em plasma, e é um teste sensível e específico³. O período de janela serológica é o tempo que decorre entre a infecção e a seroconversão do anticorpo, isto é, o período de tempo necessário para que seja possível a sua detecção, e varia entre 2 a 12 semanas^{5,10}. O diagnóstico suportado apenas na determinação do VHC Ac pode resultar na conclusão clínica errada. Este teste não tem a capacidade de diferenciar infeções ativas de infeções passadas, uma vez que na maioria dos casos o anticorpo persiste detetável em pacientes que já eliminaram o vírus^{5,10}. Este teste é utilizado como teste de rastreio em populações com risco de infecção baixo ou médio⁵.

O teste **VHC RNA** é utilizado para detecção e quantificação do RNA viral e é bastante útil para diagnosticar a infecção ativa, uma vez que esta se caracteriza pela replicação ativa do vírus. Este método é mais sensível e específico que o teste VHC Ac e o resultado é expresso em UI/ml (unidades internacionais por mL). A pesquisa do RNA pode ser realizada em amostras de soro ou plasma humano. Este teste é realizado em indivíduos com indicação para tratamento para determinação do esquema terapêutico, avaliação da resposta terapêutica e para detecção de resistências ao tratamento com DAA³. A detecção de resistências ao tratamento com DAA tem como objetivo analisar as resistências associadas a mutações no genoma viral, originando substituições de aminoácidos e a produção de novas proteínas virais levando à falência deste esquema terapêutico⁵.

O teste de determinação do **genótipo viral** é indicado como guia para o tratamento com terapia combinada (esquema terapêutico, duração da terapia e se é necessário a adição de ribavirina ao esquema terapêutico)¹. Este teste é realizado por sequenciação nucleotídica de uma porção do genoma viral. O resultado da sequenciação é, posteriormente, comparado com sequências padrão obtidas por estudo filogenético do vírus³.

O teste **VHC Ag** tem como alvo a detecção do antígeno do *core* do VHC, um epítipo expresso na nucleocápside proteica do vírus¹⁰. O teste VHC Ag foi desenvolvido em 1999²⁰. O antígeno do *core* do VHC é um marcador serológico da replicação viral alternativo ao RNA viral e é determinado através de um ensaio imunoenzimático, com limite mínimo de detecção equivalente a 500 - 3000 UI/mL VHC RNA, de acordo com o genótipo^{10,11}. Este teste é uma

alternativa igualmente eficaz e mais econômica que o teste VHC RNA para o diagnóstico da infecção aguda e para a definição da SVR^{4,10}. A sequência do antígeno do *core* é altamente conservada entre todos os genótipos e a sua detecção está associada a partículas virais completas e a complexos Ag-Ac. O antígeno livre é libertado para a circulação quando os hepatócitos sofrem apoptose imunomediada e lisam. O período de “janela de detecção” do antígeno é menor que o do anticorpo (Figura 5), 2 a 3 semanas e 12 semanas após a infecção, respectivamente¹⁰.

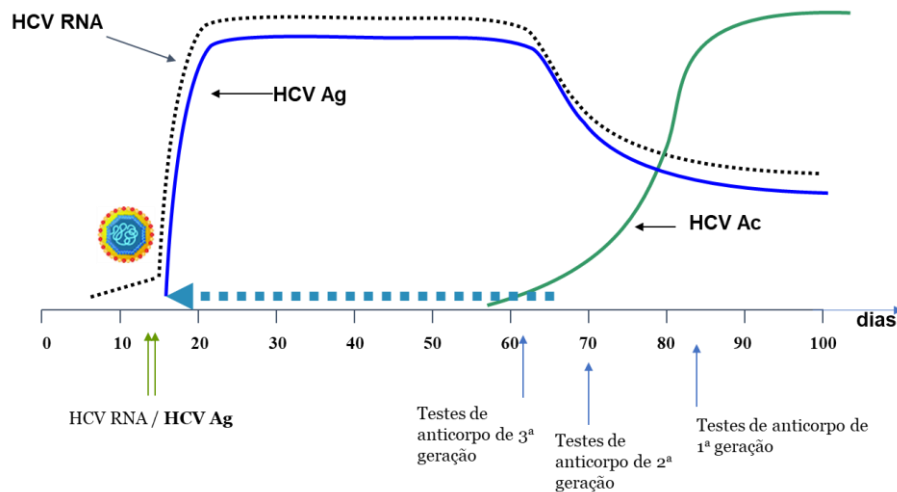


Figura 5. Gráfico dos vários períodos em que é possível determinar o RNA, o antígeno do *core* e o anticorpo do vírus da hepatite C (Abbott Laboratories).

1.5. Simplificação do algoritmo de diagnóstico

A complexidade do algoritmo laboratorial, o custo dos testes e do tratamento e a ausência de testes serológicos alternativos são alguns dos fatores que atualmente ainda limitam o rastreamento e o diagnóstico da hepatite C⁸. Atualmente, muitas pessoas ainda não têm acesso ao diagnóstico da hepatite C devido à sua complexidade e às infraestruturas laboratoriais necessárias, que não estão disponíveis a nível mundial⁴. Os países em desenvolvimento não dispõem de sistemas de saúde com as infraestruturas necessárias para realização do algoritmo laboratorial atual, nem suporte financeiro para proceder ao rastreamento da população. É necessária uma atualização e simplificação do algoritmo laboratorial de modo a que este seja acessível a toda a população e que permita, igualmente, diminuir os custos associados. Esta simplificação tem como objetivos aumentar o número de pacientes infetados identificados, reduzir a transmissão e a progressão para doença hepática, aumentar o número de pacientes que atingem a SVR e aumentar o acesso aos cuidados de saúde e ao tratamento⁸.

Para que a simplificação do algoritmo seja possível e tenha sucesso, num futuro próximo, é crucial aumentar a consciência da população acerca da hepatite C, dos seus sintomas e possíveis consequências. A atualização dos testes laboratoriais individualizada, sem uma população consciente, não é suficiente para conseguir atingir o objetivo principal desta simplificação⁸.

Ao longo dos últimos anos têm sido desenvolvidos alguns ensaios e alternativas de diagnóstico promissores. Entre os ensaios desenvolvidos destaca-se a determinação do antígeno do *core* do vírus da hepatite C (teste VHC Ag). Este ensaio é um teste constituído por um único passo que permite determinar a infeção na fase ativa^{8,10}.

A sequência do VHC Ag é altamente conservada entre os genótipos virais e apresenta elevada estabilidade biológica. Os novos ensaios comerciais do teste VHC Ag têm incluídos no seu procedimento passos pré-analíticos, onde são utilizados ácido clorídrico e detergentes com a finalidade de lisar as partículas virais e extrair as partículas de antígeno do *core*. Os complexos Ag-Ac interferem na determinação do antígeno, estando a sua presença associada a falsos negativos, sobretudo com valores de carga viral mais baixos que correspondem a níveis de VHC RNA na zona dos 15 UI/mL. A eliminação destes complexos pode aumentar a sensibilidade do método. O teste VHC Ag tem um tempo curto de resposta, cerca de 30 minutos¹⁰.

A alternativa mais viável ao algoritmo “clássico” é o teste bifásico, constituído por:

- o teste VHC Ac e o teste VHC Ag, para diagnóstico da infeção e monitorização e do tratamento;
- o teste VHC RNA, para confirmar o resultado negativo do teste VHC Ag quando os níveis de carga viral são muito baixos (Figura 6)⁸.

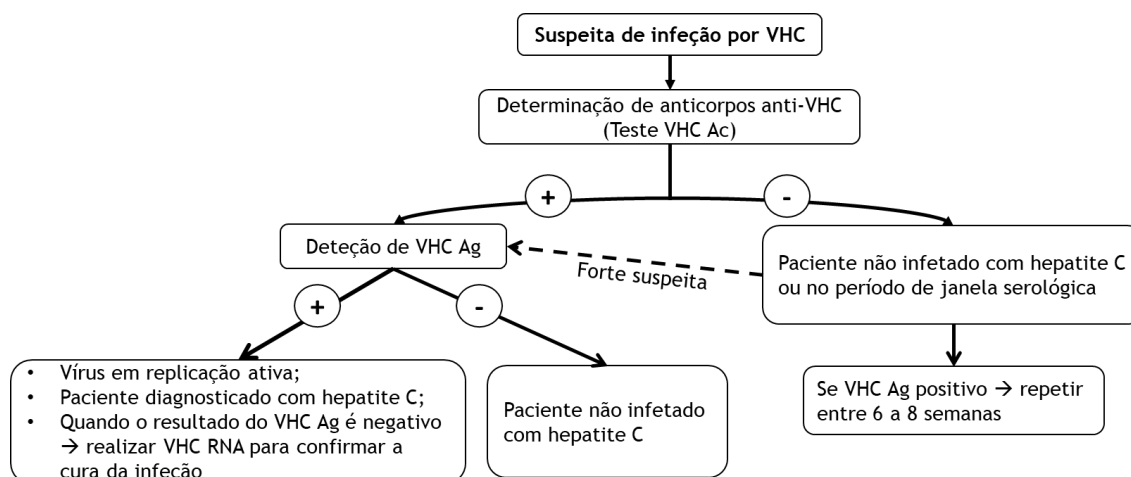


Figura 6. Fluxograma do algoritmo laboratorial alternativo e as suas conclusões (adaptado de *Fourati S. et al., 2018*)⁸.

Perante esta alternativa, na primeira fase é realizado o teste VHC Ac e, quando este é positivo, realiza-se o teste VHC Ag; quando o teste VHC Ag é negativo, devido à sensibilidade ser inferior à sensibilidade do teste de biologia molecular, deve realizar-se o teste VHC RNA, como teste confirmatório^{8,10}. Esta alternativa permite tanto o rastreio como o diagnóstico da infeção e das recaídas. A utilização do teste VHC Ag, segundo este algoritmo, pode reduzir cerca de 75% do número de testes de VHC RNA e a relação custo/benefício permite a sua aplicação em países em desenvolvimento. O teste VHC Ag permite melhorar não só o acesso ao diagnóstico, mas também a vinculação dos pacientes com o serviço de tratamento, reduzir

a perda de acompanhamento clínico do paciente e permite a simplificação do processo de monitorização^{8,10}.

O uso de esquemas terapêuticos pangenotípicos com DAA livres de interferão simplifica a monitorização do tratamento. Esta terapia, abrangente a todos os genótipos, não necessita da determinação do genótipo para enquadramento do paciente no tratamento, podendo mesmo ser eliminada como requisito para iniciar o tratamento. A monitorização não necessita de repetições sucessivas da determinação da carga viral durante o período de tratamento, permitindo a redução dos testes virológicos. A monitorização pode ser apenas realizada após o fim do tratamento para confirmar a cura (SVR), às 12 ou às 24 semanas, e realizada com o mesmo teste utilizado no diagnóstico (VHC Ag ou VHC RNA)⁸. Existem várias investigações que abordam a simplificação do algoritmo atual e têm demonstrado um bom desempenho do teste VHC Ag, sugerindo que este teste pode ser usado como teste de primeira linha para rastreio e diagnóstico da hepatite C^{4,21,22}.

O antigénio do *core* do VHC é um marcador alternativo da replicação ativa do vírus, que está associado à presença de partículas virais completas, a estruturas proteicas do *core* livres de RNA em circulação e a complexos Ag-Ac²³. O teste de VHC Ag permite antecipar o diagnóstico da hepatite C com precisão semelhante ao teste VHC RNA. Na terapia combinada foi demonstrado que os métodos VHC RNA e VHC Ag são equivalentes na monitorização do tratamento¹⁰. Em caso de recaída, a replicação do vírus da hepatite C tende a ser mais intensa; nesta situação verificou-se que o antigénio do *core* é detetado mais cedo que a carga viral devido à sua associação com as estruturas proteicas da região do *core* livres de RNA viral^{8,23}. O teste VHC Ag demonstrou ser mais sensível na deteção da falência do tratamento às 24 semanas; contudo, são necessários mais estudos para confirmar essa observação⁸.

Um ensaio experimental realizado por Rockstroh e seus colaboradores¹¹ confirmou que o teste VHC Ag, produzido pelos laboratórios Abbott, permite determinar e diagnosticar com precisão a infeção ativa em amostras com valores de VHC RNA > 50000 UI/mL. Na mesma experiência, o teste demonstrou ter precisão para identificar pacientes com recaídas e demonstrou maior relevância clínica relativamente ao teste VHC RNA para deteção das mesmas¹¹. O teste VHC Ag pode evitar a ambiguidade dos resultados de carga viral baixos (geralmente inferiores ao limite de deteção do teste VHC RNA) que podem ter origem duvidosa, como estar perante uma replicação viral incompetente^{11,21}. O teste VHC Ag apresenta algumas limitações, como apresentar uma baixa sensibilidade para detetar o antigénio em amostras com valores de VHC RNA baixos, e conseqüentemente, poder resultar em falsos negativos, contudo podem ser diminuídos com a utilização do teste VHC RNA como teste confirmatório^{11,22}.

O presente trabalho tem como objetivo investigar a utilidade e viabilidade do algoritmo de diagnóstico alternativo em pacientes diagnosticados com hepatite C no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB).

2. Material e métodos

2.1. Amostra

As amostras de soro estudadas provêm de pacientes seguidos no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, com pedido prévio de determinação de carga viral do vírus da hepatite C, entre setembro de 2018 e abril de 2019. O estudo analisa 59 amostras de pacientes seguidos no CHUCB com idades compreendidas entre 27 e 78 anos. O estudo abrange ambos os sexos, incluindo 46 amostras do sexo masculino e 13 amostras do sexo feminino. As amostras não processadas imediatamente são conservadas a -80 °C.

2.2. Desenho do estudo

Todas as amostras selecionadas preenchem dois requisitos: pedido de determinação de carga viral do vírus da hepatite C (teste VHC RNA) realizado pelo médico assistente e dispor de volume de amostra suficiente para realizar o ensaio VHC Ag. Nas amostras selecionadas foram analisados dados previamente determinados como VHC RNA, determinação do anticorpo contra o vírus da hepatite C (teste VHC Ac), concentração serológica da enzima alanina aminotransferase (ALT) e determinação do genótipo viral. As amostras foram depois processadas no equipamento ARCHITECT™ i2000sr (Figura 17) para quantificação do antigénio do *core* do vírus da hepatite C (teste VHC Ag).

2.2.1. Determinação do anticorpo para o vírus da hepatite C

O teste VHC Ac (Roche Diagnostics) é um ensaio de 3ª geração realizado no equipamento Cobas® 6000 (Figura 15) que deteta qualitativamente os anticorpos anti-VHC em amostras de soro ou plasma humano. Este ensaio utiliza péptidos e antigénios recombinantes que representam as proteínas do *core*, NS3 e NS4 para deteção dos anticorpos anti-VHC através do método imunoenzimático de eletroquimioluminescência em “sandwich” (Capítulo 2.3.1).

O pack de reagentes é constituído por micropartículas revestidas com estreptavidina, antigénios específicos para VHC conjugados com biotina e antigénios específicos marcados com o complexo ruténio. Numa primeira fase os antigénios marcados com biotina e os antigénios marcados com ruténio são incubados juntamente com a amostra e formam um complexo em forma de “sandwich”. Seguidamente é adicionada a solução de micropartículas; a estreptavidina e a biotina interagem entre si, permitindo que o complexo se ligue à fase sólida e todas as substâncias não ligadas sejam eliminadas. O composto ruténio emite um sinal eletroquimioluminescente detetado por quimioluminescência.

2.2.2. Determinação da carga viral do vírus da hepatite C

A deteção de VHC RNA (Roche Diagnostics) é realizada no equipamento Cobas® 4800 (Figura 20) num processo de dois passos: extração das partículas de RNA viral e quantificação pela técnica PCR em tempo real. Este teste deteta e quantifica o RNA do VHC e utiliza dois *primers* para deteção de zonas altamente conservadas do vírus. As células são lisadas por

adição de proteinase e reagente de lise (contém tiocianato de guanidina, um desnaturante proteico que lisa as partículas virais e protege os ácidos nucleicos da atividade das enzimas RNase e DNase), os ácidos nucleicos ligam-se às partículas de vidro magnéticas e todas as substâncias não ligadas às micropartículas são eliminadas por passos de lavagem. O tampão de eluição permite que as moléculas de ácido nucleico purificadas se separem das micropartículas.

Na reação de PCR ocorre a transcrição do RNA em DNA complementar (cDNA), a ligação dos *primers* específicos para as regiões conservadas do vírus e a hibridização da cadeia de DNA com uma sonda marcada com um fluoróforo. A amplificação da cadeia é realizada pela enzima DNA polimerase que sintetiza uma cadeia de cDNA complementar à sequência do vírus VHC. Por cada ciclo de PCR são geradas novas cadeias de cDNA hibridizadas com uma sonda que, quando clivada, emite um sinal fluorescente; a fluorescência é diretamente proporcional à concentração das cadeias de cDNA presentes na amostra. O resultado é expresso em UI/mL VHC RNA. Este método tem um limite de quantificação mínimo de 15 UI/mL.

2.2.3. Determinação do antígeno do *core* do vírus da hepatite C

A determinação quantitativa do VHC Ag (Abbott Laboratories) é um imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência realizado no equipamento ARCHITECT™ i2000sr. As micropartículas estão revestidas com anticorpos monoclonais anti-VHC com afinidade para partículas de antígeno que possam estar presentes no soro ou no plasma humano.

Neste ensaio a amostra é incubada com o reagente de pré-tratamento com objetivo de lisar as partículas virais e posteriormente com um diluente específico e com micropartículas revestidas com anticorpos anti-VHC. O VHC Ag presente na amostra liga-se às micropartículas, que após lavagem e pré-ativação com solução ativadora, é detetado por quimioluminescência. O resultado é obtido em unidades relativas de luz (RLU) e relaciona-se diretamente com a concentração de VHC Ag presente na amostra. A concentração de VHC Ag é extrapolada através da curva de calibração do ensaio realizada previamente. A amostra é considerada reativa quando a concentração é ≥ 3 fmol/L, e não reativa com valores de VHC Ag < 3 fmol/L.

2.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS (versão 25), na qual se realizaram análises univariáveis, bi- e multivariáveis com um nível de confiança de 95%. A amostra não se encontra distribuída segundo a Curva de Gauss, isto é, não tem uma distribuição normal. Foi necessário linearizar as variáveis VHC RNA e VHC Ag para $\log(\text{VHC RNA})$ e $\log(\text{VHC Ag})$. Os estudos de correlação foram realizados segundo o *Teste de Spearman*, enquanto que para estudos de comparação entre grupos foi utilizado o *Teste de Mann-Whitney U* (análise de dois grupos) e o *Teste de Kruskal-Wallis* (análise de três ou mais grupos). Foi também utilizado o programa GraphPad Prism (versão 8) para obter o gráfico da Figura 10b.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

Nas 59 amostras incluídas no estudo foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: VHC RNA, VHC Ag, VHC Ac, a concentração de ALT no soro e o genótipo viral do VHC. Estes dados estão resumidos nas Tabelas 1 e 2. Nesta amostra populacional, a idade varia entre 27 e 78 anos, 78% das amostras são do sexo masculino (n = 46) e 33,9 % das amostras pertencem ao genótipo 1a (n = 20). O valor médio de carga viral (VHC RNA) foi 5,76 log(UI/mL) e o valor médio de antigenemia (VHC Ag) foi de 2,46 log(fmol/L) (Tabela 1). Os parâmetros VHC RNA e VHC Ag foram determinados nas 59 amostras.

Tabela 1. Características demográficas e virais da população em estudo.

Características demográficas	N
Idade, mediana, (anos)	47 (27 - 78)
Sexo masculino, n (%)	46 (78)
Sexo feminino, n (%)	13 (22)
Características virais	
Nível de VHC RNA, média, log (UI/mL)	5,76 (1,31 - 7,47)
Nível de VHC Ag, média, log (fmol/L)	2,96 (0 - 4,54)
Genótipo do VHC, n (%)	
Genótipo 1a	20 (33,9)
Genótipo 1b	2 (3,4)
Genótipo 3a	9 (15,3)
Genótipo 4a/4c/4d	5 (8,5)

Utilizando o teste VHC RNA, 17 amostras foram classificadas como negativas para infecção ativa (VHC RNA não detetável) e 42 foram classificadas como positivas para infecção ativa (VHC RNA detetável). A avaliação realizada posteriormente pelo teste VHC Ag teve resultados diferentes dos obtidos com o teste VHC RNA. O teste VHC Ag determinou 22 amostras negativas para infecção por hepatite C na fase ativa (VHC Ag não reativo) e 37 amostras positivas para infecção ativa (VHC Ag reativo). Todas as amostras determinadas como reativas para VHC Ag foram também positivas para VHC RNA (37/37). Nas amostras determinadas como não reativas para o antígeno do VHC (n = 22) foi possível detetar a presença de RNA circulante por uma técnica de biologia molecular (VHC RNA) em 5 amostras, sendo o resultado das restantes amostras (17/22) concordante entre os dois testes. O anticorpo anti-VHC foi detetado em 43 amostras, sendo que para 16 não há qualquer indicação da realização da sua pesquisa. Nas 43 amostras reativas para o anticorpo anti-VHC foi possível detetar RNA viral em 31 amostras. A determinação da concentração da enzima ALT foi realizada em 36 amostras e destas apenas 18 demonstraram níveis de ALT superiores aos valores de referência (Tabela 2). O RNA viral foi detetado tanto em amostras com valores normais de ALT (n = 17) como em amostras com valores superiores aos valores de referência (n = 18) (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos parâmetros analíticos envolvidos no diagnóstico laboratorial da hepatite C e comparação com o método de referência (VHC RNA).

		VHC Ag		VHC Ac		ALT	
		Reativo	Não reativo	Reativo	Não reativo	Normal	Elevada
VHC RNA	Detetável	37	5	31	0	17	18
	Não detetável	0	17	12	0	1	0

A determinação do genótipo foi realizada em 36 amostras. Os genótipos detetados foram o genótipo 1a (n = 19), genótipo 1b (n = 2), genótipo 3a (n = 9) e genótipo 4a/4c/4d (n = 5). Estes dados encontram-se resumidos na Figura 7.

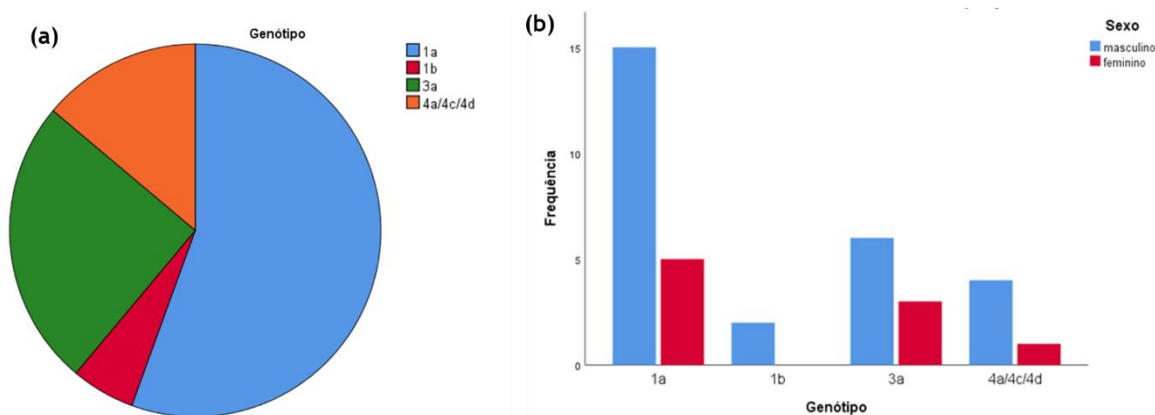


Figura 7. (a) Avaliação da distribuição do genótipo viral na amostra; (b) Avaliação do genótipo viral segundo o gênero.

As amostras em que não foi detetado RNA viral não foram analisadas em relação ao gênero e ao genótipo.

3.1.1. Influência do gênero nas variáveis VHC RNA e VHC Ag

Por o valor “VHC RNA < 15 UI/mL” não ser um valor finito, as 4 amostras com este resultado não foram incluídas na análise da variável VHC RNA em relação ao gênero.

Relativamente à carga viral (Figura 8a), o grupo do sexo masculino (n = 29) apresentou um valor médio de $5,53 \pm 0,33 \log(\text{UI/mL})$, ligeiramente menor do que o valor médio para o grupo do sexo feminino (n = 9), que foi de $6,49 \pm 0,15 \log(\text{UI/mL})$. Foi possível verificar que em relação ao valor de antigenemia esta relação entre os grupos permanece (Figura 8b). O sexo feminino (n = 10) apresentou o valor médio de antigenemia de $3,33 \pm 0,39 \log(\text{fmol/L})$, mais elevado que o grupo do sexo masculino (n = 30) que apresentou um valor médio de $2,83 \pm 0,25 \log(\text{fmol/L})$. A análise estatística realizada entre estes dois grupos (sexo feminino e masculino) determinou que as diferenças observadas relativamente às duas variáveis analisadas (VHC RNA e VHC Ag) não são estatisticamente significativas.

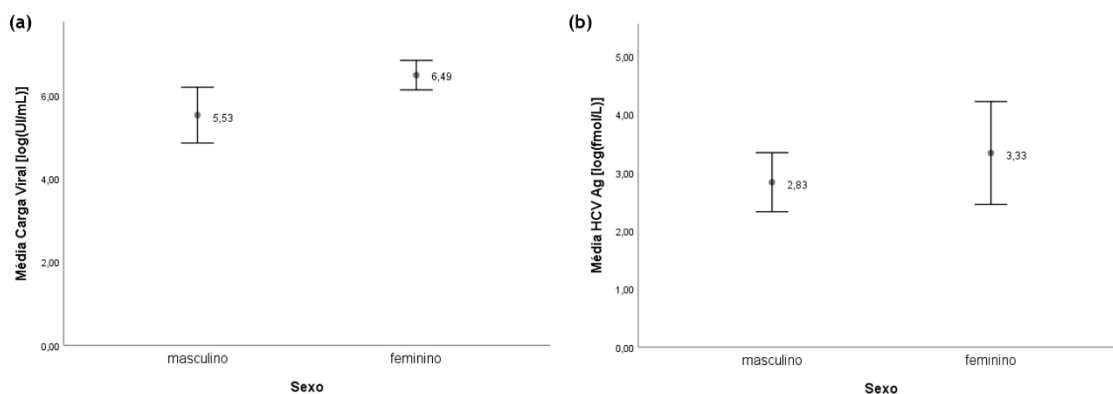


Figura 8. Avaliação das variáveis VHC RNA e VHC Ag segundo o gênero. (a) Distribuição da variável VHC RNA segundo o sexo; (b) Distribuição da variável VHC Ag segundo o sexo.

3.1.2. Influência do genótipo nas variáveis VHC RNA e VHC Ag

Nesta análise as amostras foram distribuídas segundo três genótipos: genótipo 1 (subgenótipo 1a e 1b), genótipo 3 (subgenótipo 3a) e genótipo 4 (subgenótipo 4a/4c/4d).

Relativamente à carga viral (Figura 9a), o genótipo 1 apresentou o maior valor médio ($6,02 \pm 0,29$ log(UI/mL)) comparativamente ao genótipo 3 ($5,60 \pm 0,85$ log(UI/mL)) e ao genótipo 4 ($5,67 \pm 0,36$ log(UI/mL)). Esta relação entre os genótipos permanece ao nível da antigenemia (Figura 9b). O genótipo 1 é o genótipo que apresenta o valor médio de antigenemia mais elevado ($3,34 \pm 0,23$ log(fmol/L)) comparativamente ao genótipo 3 ($2,75 \pm 0,58$ log(fmol/L)) e ao genótipo 4 ($2,93 \pm 0,32$ log(fmol/L)), que apresentam valores médios mais baixos. A análise estatística realizada entre os diferentes genótipos determinou que as diferenças observadas relativamente às duas variáveis analisadas (VHC RNA e VHC Ag) não são estatisticamente significativas.

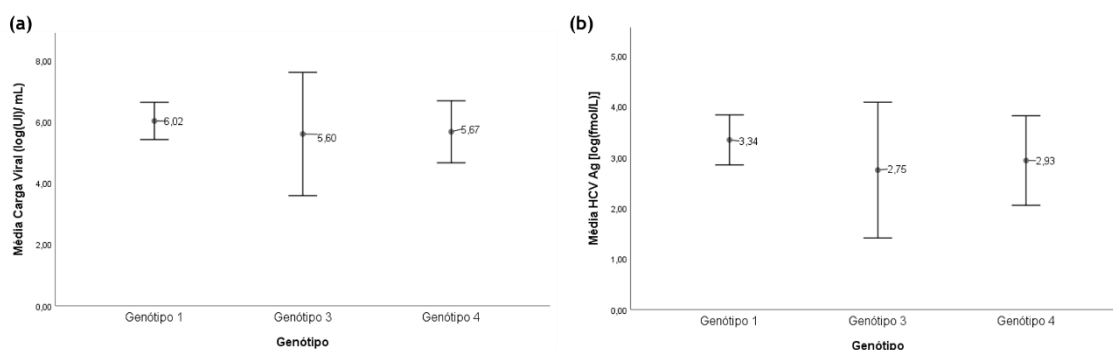


Figura 9. Avaliação das variáveis VHC RNA e VHC Ag segundo o genótipo. (a) Distribuição da variável VHC RNA segundo o genótipo; (b) Distribuição da variável VHC Ag segundo o genótipo.

3.2. Correlação e regressão linear entre VHC RNA e VHC Ag

Os valores obtidos utilizando o teste VHC RNA e os obtidos com o teste VHC Ag demonstram uma forte correlação (ρ de Spearman = 0,963) (Figura 10a) indicando que a maioria dos dados são concordantes. Esta relação entre as variáveis foi também estudada para valores de VHC RNA superiores a 3000 UI/mL; a correlação entre as variáveis

permaneceu forte (ρ de Spearman = 0,948) indicando que os resultados são maioritariamente concordantes (Figura 10b). Todas as amostras com carga viral superior a 3000 UI/mL ($n = 33$) foram reativas para o teste VHC Ag. Relativamente às amostras com valores de carga viral inferiores a 3000 UI/mL, 40 % das amostras (2/5) foram não reativas segundo o teste VHC Ag.

Com base nas amostras incluídas neste estudo foi possível estabelecer um modelo linear que permite extrapolar o valor de carga viral, que seria determinado pela técnica de biologia molecular (VHC RNA), a partir do valor de antigenemia determinado pelo teste VHC Ag. O modelo linear determinado pode ser observado na Figura 10 e cuja equação correspondente é $VHC\ Ag = 0,731 \cdot [VHC\ RNA] - 1,109$ (Figura 10a).

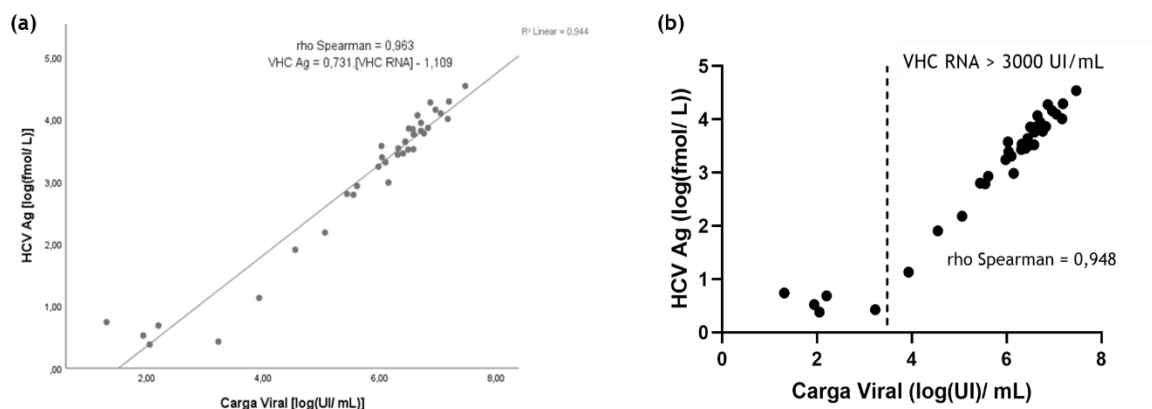


Figura 10. Correlação entre os níveis de VHC RNA e VHC Ag. (a) Correlação entre as variáveis englobando todas as amostras; (b) Avaliação da correlação entre as variáveis pelo limiar de VHC RNA > 3000 UI/mL.

3.3. Performance do teste VHC Ag no diagnóstico da infeção

Durante o estudo foi possível identificar que algumas amostras incluídas pertenciam ao mesmo paciente. Foram identificados dois pacientes (A e B), do sexo masculino, cada um com duas amostras que foram alvo de estudo. Nestes dois pacientes avaliou-se a concordância entre os valores de carga viral, os valores de antigenemia e o diagnóstico final como se encontra resumido na Tabela 3. Na amostra 2 do paciente A o diagnóstico entre os dois testes não foi concordante (encontram-se referidos mais dados sobre esta amostra na Tabela 4). Segundo o método de referência (VHC RNA) a amostra contém RNA viral em circulação tendo como diagnóstico laboratorial infeção por hepatite C em fase ativa. Pelo teste VHC Ag a amostra tem como resultado “não reativo”; apesar do valor obtido ser muito próximo do valor de referência para a amostra ser considerada “reativa” ($VHC\ Ag \geq 3,00\ \text{fmol/L}$) o teste indica que o paciente A não está infetado. O teste VHC Ag falhou no diagnóstico da amostra 2 do paciente A, sendo o diagnóstico final infeção por hepatite C na fase ativa.

Tabela 3. Avaliação da *performance* do teste VHC Ag no diagnóstico laboratorial de dois pacientes.

Paciente	Amostra	VHC RNA			VHC Ag			Diagnóstico
			UI/mL	logUI/mL		fmol/L	logfmol/L	
A	1	Detetável	2050000,0	6,31	Reativo	2729,30	3,44	Infeção ativa
	2	Detetável	112,0	2,05	Não reativo	2,40	0,38	Não concordante
B	1	Detetável	35500,0	4,55	Reativo	80,37	1,91	Infeção ativa
	2	Detetável	277000,0	5,44	Reativo	635,07	2,80	Infeção ativa

Pela análise dos gráficos (a) e (b) representados na Figura 11, o comportamento dos dois pacientes sugere que o valor de RNA tende a ser superior ao valor do antígeno. Esta observação é sugestiva de que o teor de RNA viral no soro possa ser superior ao teor do antígeno do *core* do VHC; este facto pode ser devido à interação das partículas de antígeno do *core* com anticorpos anti-VHC, formando complexos que interferem na quantificação do VHC Ag. Relativamente ao paciente A é possível observar que tanto os níveis de carga viral como os de antigenémia diminuem da amostra 1 para a amostra 2. Contudo, é possível verificar que o declive da determinação da carga viral é superior ao declive da determinação dos níveis de antigenémia (Figura 11a). Esta diferença entre declives sugere que em termos de valores absolutos a carga viral tem uma diminuição mais acentuada que a antigenémia. Relativamente ao paciente B verifica-se um aumento dos níveis de carga viral e de antigenémia da amostra 2 em comparação à amostra 1, sendo que neste caso os declives são iguais (Figura 11b) indicando que as duas variáveis aumentaram na mesma proporção.

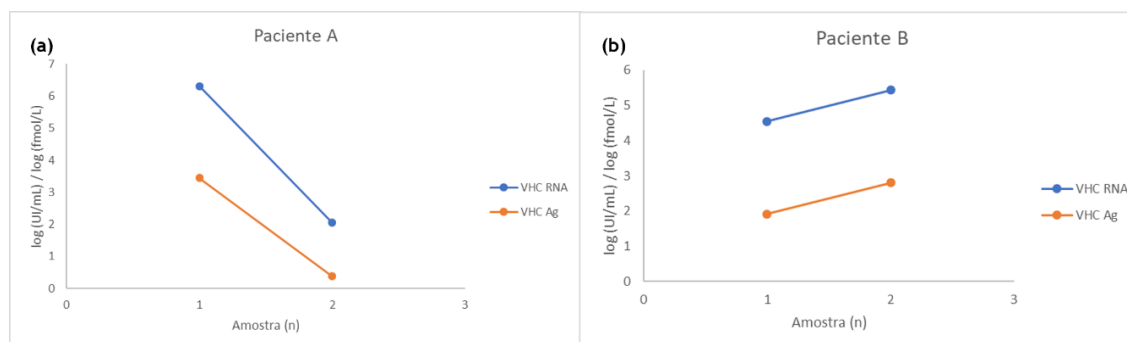


Figura 11. Avaliação do comportamento do teste VHC Ag no seguimento da infeção. (a) Avaliação da evolução do paciente A; (b) Avaliação da evolução do paciente B.

3.4. Resultados discordantes entre VHC RNA e VHC Ag

Das 59 amostras em estudo, 7 não foram totalmente concordantes no resultado quantitativo e qualitativo das variáveis VHC RNA e VHC Ag. Em 4 das 7 amostras referidas (amostras 1 a 4 da Tabela 4) foi possível detetar a presença de RNA viral pela técnica de biologia molecular, embora não tenha sido possível quantificá-lo. Contudo, estas mesmas

amostras foram classificadas como não reativas segundo o teste VHC Ag. Na amostra 5 não foi detectado RNA viral circulante, embora o valor de antigenemia esteja muito próximo do valor de referência para a amostra ser classificada como reativa segundo o teste VHC Ag (VHC Ag \geq 3,00 fmol/L). Nas amostras 6 e 7 foi possível detectar níveis de carga viral em ambas, 2,05 log(UI/mL) e 3,23 log(UI/mL) respectivamente, sendo classificadas como amostras com replicação/infeção ativa. Contudo, os níveis de antigenemia não são concordantes e classificam ambas as amostras como “amostras sem infecção ativa”, sendo os valores de antigenemia 0,38 log(fmol/L) para a amostra 6 e 0,43 log(fmol/L) para a amostra 7 (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo dos dados discordantes entre as variáveis VHC RNA e VHC Ag.

Amostra	VHC RNA			VHC Ag			VHC Ac
		UI/mL	logUI/mL		fmol/L	logfmol/L	
1	Detetável	< 15	-	Não reativo	1,01	0,00	Reativo
2	Detetável	< 15	-	Não reativo	0,00	-	Sem informação
3	Detetável	< 15	-	Não reativo	0,00	-	Reativo
4	Detetável	< 15	-	Não reativo	0,00	-	Reativo
5	Não detetável	-	-	Não reativo	2,89	0,46	Reativo
6	Detetável	112,0	2,05	Não reativo	2,40	0,38	Reativo
7	Detetável	1690,0	3,23	Não reativo	2,67	0,43	Sem informação

4. Discussão

Neste estudo foi possível constatar que o sexo masculino tem maior prevalência de infecção por hepatite C no CHUCB. Apesar da diferença verificada entre os sexos não ser significativa, quer na carga viral quer na antigenemia, o grupo do sexo feminino apresentou nas duas análises valores mais elevados de RNA e antígeno do VHC (Figura 8). As idades do grupo feminino estão compreendidas entre os 37 e os 78 anos; assim, no grupo feminino estão inseridas mulheres que ainda se encontram em idade fértil e mulheres que já se encontram na menopausa. A heterogeneidade do grupo feminino pode ser explicativa das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas.

O genótipo predominante na população da Cova da Beira é o genótipo 1a. A análise da carga viral e da antigenemia, tendo em conta os vários genótipos identificados, não demonstrou ser estatisticamente diferente (Figura 9). Este resultado pode ser devido ao tratamento destes pacientes com DAA, utilizados para o tratamento dos diferentes genótipos; o tratamento com DAA foi iniciado no hospital no ano de 2015²⁴.

De todos os parâmetros analíticos avaliados, aquele que demonstrou maior concordância com o parâmetro de referência (VHC RNA) foi o parâmetro VHC Ag. O teste VHC Ag demonstrou elevada concordância com o teste VHC RNA, apresentando 100% de especificidade e 88,1% de sensibilidade analítica. O doseamento da enzima ALT no soro foi o parâmetro analítico com menor concordância com o teste VHC RNA. Este resultado já era esperado, uma vez que a concentração de ALT pode estar elevada em diversas situações, incluindo o consumo de álcool ou de esteróides e outras infecções virais que afetem o fígado²⁵.

Foi determinado um modelo de regressão linear, uma vez que os valores obtidos pelos testes VHC RNA e VHC Ag demonstraram uma elevada correlação entre si (rho de Spearman = 0,963). A determinação do valor de carga viral tendo em conta o modelo linear determinado (Anexo I) demonstra que os resultados obtidos são ligeiramente diferentes dos obtidos com o teste VHC RNA. Segundo Ottiger e seus colaboradores²⁶ os valores de carga viral calculados empiricamente a partir do modelo de regressão linear podem apresentar uma diferença até $0,4 \pm 0,37 \log(\text{UI/mL})$ dos valores de carga viral reais (determinados pelo teste VHC RNA). Seguindo este mesmo requisito, observou-se que em 35 das 40 amostras analisadas o resultado obtido pela reta confirma o diagnóstico de hepatite C ativa. O valor de carga viral quantificável mais baixo determinado nas amostras selecionadas foi de $1,31 \log(\text{UI/mL})$ que corresponde a 20,3 UI/mL; o valor de carga viral mais baixo determinado pelo modelo linear é $1,52 \log(\text{UI/mL})$, superior ao determinado pelo teste. Esta evidência é sugestiva de que se deve recorrer à determinação da carga viral pelo teste VHC RNA sempre que o resultado seja igual ao valor mínimo de carga viral determinado pelo modelo (VHC Ag = $0 \log(\text{fmol/L})$).

Foi possível acompanhar a monitorização da carga viral e a antigenemia de dois pacientes (A e B), cada um com duas amostras colhidas em datas diferentes (Tabela 3). Na monitorização do paciente A é possível observar a diminuição da carga viral e da antigenemia; este paciente encontra-se em tratamento e em fase de resolução da infecção. É possível verificar que a carga viral diminui de forma mais acentuada que a antigenemia (Figura 11a),

como se pode verificar pelos valores obtidos nas duas amostras pelos testes VHC RNA e VHC Ag; na escala logarítmica, a diminuição da carga viral foi de -4,26 enquanto que relativamente à antigenémia a diminuição foi de -3,06. Esta observação deve-se ao facto de os DAA atuarem ao nível das proteínas virais não estruturais envolvidas no ciclo de replicação do VHC, inibindo-a. Em relação ao paciente B, que se encontra em fase de replicação ativa e sem tratamento, é possível verificar que o aumento da carga viral e da antigenémia ocorreu de forma proporcional (Figura 11b), sendo o aumento na escala logarítmica, em ambas as variáveis, de +0,89.

Foram identificadas 7 amostras nas quais a interpretação do resultado do teste VHC RNA foi discordante do resultado do teste VHC Ag (Tabela 4). Nas amostras 1, 3 e 4 foi possível detetar RNA viral, mas não foi possível quantificá-lo (VHC RNA < 15 UI/mL) e foi detetada a presença de anticorpos anti-VHC. Na amostra 2 foi possível detetar RNA viral inferior ao limite de quantificação, como observado nas amostras anteriores, contudo não há qualquer informação acerca da pesquisa de anticorpos anti-VHC; o facto do paciente se encontrar em tratamento sugere que o paciente estava em fase de remissão, sendo provável que a amostra contenha anticorpos anti-VHC. Nas amostras com carga viral detetável, VHC Ag não reativo e anticorpo anti-VHC reativo, é possível que a presença de anticorpos anti-VHC interfira com a deteção do antigénio do *core*²². Este fenómeno tem sido descrito ao longo de vários anos. Num trabalho desenvolvido por Peterson e colaboradores²⁰, em 1999, foi desenvolvido um ensaio de ELISA para a determinação do antigénio do *core* do VHC; neste ensaio a deteção do antigénio do *core* do VHC diminuiu quando era detetada a presença de anticorpos anti-VHC na amostra. Peterson e colaboradores sugeriram que o VHC Ag poderia negatizar após o desenvolvimento do anticorpo anti-VHC, sendo que a presença do anticorpo é considerada uma interferência para a deteção do antigénio do *core* devido à formação de complexos Ac-Ag, que não permitem que o antigénio esteja disponível para ser detetado. Freiman e seus colaboradores²⁷ referem num trabalho realizado em 2016 que é necessário otimizar a deteção do VHC Ag para que este possa ser utilizado em “point-of-care”; esta otimização consiste em três passos (1) é necessário que as partículas virais sofram o processo de lise, (2) é necessário expor o antigénio e (3) é necessário dissociar os complexos Ag-Ac. É também referido na bula do reagente VHC Ag ARCHITECT (*Abbott Laboratories*) que a realização deste teste no mesmo equipamento em que é realizado o teste ARCHITECT Anti-VHC pode resultar em resultados falsamente elevados relativamente ao teste VHC Ag.

Relativamente à amostra 5 (Tabela 4), não foi detetado RNA viral em circulação e o resultado do teste VHC Ag foi “não reativo”. Contudo o valor detetado pelo teste VHC Ag (VHC Ag = 2,89 fmol/L) foi muito próximo do valor de referência (VHC Ag \geq 3,00 fmol/L) para a amostra ser classificada como reativa. Perante este resultado podem colocar-se duas hipóteses: o valor de antigenémia detetado pode ser resultante da disrupção dos complexos Ag-Ac ou pode ser preditivo de uma recaída virológica. O paciente referente a esta amostra tem histórico de infeção por hepatite C e foi dado como curado no ano de 2016, não havendo qualquer informação, acerca deste, desde então. Tendo em conta o histórico do paciente e

uma vez que não foi possível detetar RNA viral em circulação, a hipótese mais provável é estar perante uma situação de reinfeção pelo vírus da hepatite C. Este fenómeno tem sido relatado em alguns trabalhos científicos; entre eles encontra-se um trabalho realizado com indivíduos do sexo masculino que têm relações sexuais com outros indivíduos do sexo masculino infetados com VIH e que revelou que o teste VHC Ag tem demonstrado ser útil na deteção de reinfeções pelo vírus da hepatite C em indivíduos infetados com VIH²⁵. Foi observado por Garbuglia e colaboradores²⁸ que apenas uma porção de VHC Ag está associado com partículas virais completas, sugerindo que algumas partículas de VHC Ag circulantes podem ser secretadas por células infetadas. Essa observação pode ser devida à baixa ou mesmo ineficaz replicação viral, sobretudo perante a fase de remissão da infeção²⁸. Este trabalho apoia a hipótese de que o valor de VHC Ag na amostra 5 pode ser preditivo de uma recaída virológica.

Relativamente às amostras 6 e 7 (Tabela 4), foi detetado e quantificado RNA viral em circulação; contudo, o teste VHC Ag classificou ambas as amostras como não reativas. A carga viral detetada em ambas as amostras é inferior a 3000 UI/mL, valor até ao qual se tem verificado que a *performance* do teste VHC Ag fica comprometida. Nesta gama de valores não existe qualquer relação entre os valores obtidos com os dois testes, como se pode observar na Figura 10b; os resultados destas duas amostras são falsos negativos determinados pelo teste VHC Ag. É importante ressaltar que nestas duas amostras a sequência da proteína do *core* possa estar alterada; este fenómeno tem sido descrito embora seja pouco frequente^{11,28}. Contudo uma limitação do estudo é a impossibilidade de realizar a sequenciação da proteína do *core* presente em ambas as amostras, uma vez que esta técnica de biologia molecular não é realizada no hospital CHUCB e é uma técnica dispendiosa; caso este algoritmo estivesse implementado no hospital era um passo crucial para o diagnóstico que não poderia ser eliminado.

Os pacientes referentes às amostras 1 a 4 e à amostra 6 (Tabela 4) encontram-se a realizar tratamento para a infeção, sendo os resultados descritos acima indicativos da baixa reprodutibilidade do teste VHC Ag para monitorização terapêutica quando os níveis de carga viral são baixos.

Relativamente à amostra 7 não há qualquer informação anterior sugerindo que se possa estar perante um provável diagnóstico da infeção. Assumindo esta hipótese o teste VHC Ag falhou no seu diagnóstico. Nesta amostra era crucial a conjugação dos dados laboratoriais com os dados clínicos para melhor compreensão dos resultados.

No presente estudo foram apenas avaliados parâmetros analíticos, não houve qualquer acesso à informação clínica; este facto pode ser uma limitação, do estudo desenvolvido, a nível de compreensão de alguns resultados discrepantes.

5. Conclusão

Neste trabalho foi avaliada a viabilidade do algoritmo alternativo para o diagnóstico laboratorial da hepatite C. O principal objetivo deste algoritmo é identificar o maior número de indivíduos infetados com hepatite C para erradicar a infecção, como proposto pela OMS, antecipando o diagnóstico da infecção. A população estudada é bastante heterogênea permitindo que fosse possível estudar este algoritmo, particularmente o teste VHC Ag, para o diagnóstico, monitorização terapêutica e recaídas virológicas.

O teste VHC Ag demonstrou ser eficaz no diagnóstico da infecção ativa, contudo apresenta menor sensibilidade (88,1%) que o teste de referência (VHC RNA). A nível de monitorização terapêutica foi possível identificar algumas discordâncias. A relação entre os testes VHC RNA e VHC Ag parece diminuir para valores inferiores a 3000 UI/mL; esta observação sugere que o mais indicado será realizar o teste VHC RNA perante o primeiro resultado não reativo pelo teste VHC Ag num paciente em que foi detetada a presença de anticorpos anti-VHC, de forma a eliminar falsos negativos do teste VHC Ag. Existe uma elevada possibilidade de ter sido detetada uma recaída virológica segundo o teste VHC Ag durante o estudo, contudo até ao fim do presente trabalho esta possibilidade permanece por esclarecer.

Os resultados não concordantes do teste VHC Ag estão compreendidos entre 2,00 e 2,99 fmol/L, sugerindo que esta gama de valores corresponderia à “zona cinzenta” do teste. A “zona cinzenta” deve ser sempre ajustada à população em estudo; esta “zona cinzenta” compreende uma gama de valores inferiores aos referidos pela casa comercial (*Abbott Laboratories*), que se situam entre 3,00 e 10,00 fmol/L.

O teste VHC Ag e o algoritmo alternativo permitem um diagnóstico antecipado da infecção, devido ao período de janela serológica do antigénio ser inferior ao do anticorpo; contudo este teste tem algumas limitações, como referido anteriormente. É necessário ter conhecimento das limitações e alternativas do teste e do algoritmo alternativo, para que não ocorra a interpretação errada dos resultados. Qualquer resultado duvidoso deve ser sempre confirmado; o teste VHC RNA é o teste confirmatório do teste VHC Ag e a sua utilização permite diminuir a probabilidade de um diagnóstico incorreto.

Em conclusão, os resultados obtidos confirmam que o teste VHC Ag é útil no diagnóstico precoce da infecção, podendo aumentar o número de indivíduos identificados e a sua vinculação ao hospital e ao tratamento. A informação clínica é fundamental para um diagnóstico laboratorial correto. Todas as conclusões devem ser baseadas num conjunto de informações (clínicas, laboratoriais e complementares) que não se encontram disponíveis.

Capítulo 2: Estágio Curricular no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira

2.1. Caracterização do Centro Hospitalar

O Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB), E.P.E constitui uma unidade do Serviço Nacional de Saúde português e tem influência, principalmente, nas populações residentes nos concelhos da Covilhã, Fundão, Belmonte e Penamacor²⁹.

O Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira oferece serviços médicos na área da Cardiologia, Reumatologia, Imunoalergologia, Neurologia, Alcoologia, Infeciologia, Nutrição e Atividade Física, Oncologia, Medicina Interna, Gastroenterologia, Hematologia, Medicina Paliativa, Pneumologia e Psiquiatria. Este centro hospitalar oferece ainda serviços cirúrgicos, medicina preventiva, Obstetrícia e Ginecologia, Medicina Reprodutiva, Neonatologia e meios complementares de diagnóstico. O CHUCB apresenta quatro unidades cruciais para o seu funcionamento: Urgência, Urgência Pediátrica, Internamento e Consulta Externa²⁹.

2.2. Caracterização do Laboratório de Patologia Clínica

O Laboratório de Patologia Clínica (LPC) está inserido nos meios complementares de diagnóstico e situa-se no piso 0 do Hospital Pêro da Covilhã²⁹. Este meio complementar de diagnóstico é dos mais importantes e cruciais, uma vez que a maioria das decisões médicas/ clínicas são tomadas com base nos resultados de análises realizadas no laboratório³⁰.

O serviço de patologia clínica tem como missão:

- “recolher produtos biológicos aos utentes que recorrem ao serviço, efetuando a determinação analítica dos parâmetros solicitados, de forma a complementar o diagnóstico clínico e instituição de uma terapêutica adequada;
- efetuar colheitas em segurança, auscultando o grau de satisfação dos utentes de forma a melhorar a qualidade do serviço prestado;
- efetuar determinações analíticas fiáveis em tempo útil, baseadas na atualização técnica na qualidade e na automatização;
- motivar os colaboradores, delegando níveis de competência e promovendo a formação profissional;
- participar no ensino pré-graduado e pós-graduado;
- participar em projetos de investigação.”

O laboratório encontra-se dividido nas seguintes secções: Imunoquímica, Microbiologia, Endocrinologia, Hematologia, Autoimunidade, Virologia e laboratório de urgência. O laboratório tem ainda gabinetes, salas de reuniões, vestiários e copas.

Existe um sistema intranet, que engloba os computadores e todos os autoanalisadores onde são processadas as amostras. Estes equipamentos estão ligados ao *software Modulab*, permitindo o acesso a todas as informações acerca das amostras, sejam elas os pedidos dos clínicos, resultados analíticos ou a localização do tubo de amostra, a qualquer pessoa devidamente autorizada.

As amostras biológicas processadas no laboratório são líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, urina, esperma, soro, plasma, sangue total e fezes. As amostras de sangue são colhidas para tubos específicos consoante os parâmetros analíticos a determinar e as técnicas a utilizar.

Os **tubos com tampa vermelha** (Figura 12a) contêm EDTA, um agente quelante que evita que o sangue coagule. Estes tubos são utilizados para estudo de células hematológicas³⁰.

Os **tubos de tampa verde** contêm citrato (Figura 12b), um anticoagulante que preserva os fatores de coagulação lábeis; estes tubos são utilizados para estudos de coagulação. Os tubos de tampa roxa (Figura 12c) também contêm citrato e têm como objetivo o estudo da velocidade de sedimentação dos eritrócitos³⁰.

Os **tubos de tampa castanha** (Figura 12d) contêm um gel separador, que após retração do coágulo e centrifugação origina uma barreira física entre o soro e os elementos figurados do sangue. Estes tubos não contêm anticoagulante³⁰. Os tubos de soro são utilizados para a maioria das análises de bioquímica clínica, endocrinologia e imunologia.

Os **tubos de tampa laranja** (Figura 12e) contêm heparina-lítio; a heparina é um anticoagulante que em baixas concentrações não afeta significativamente a determinação dos parâmetros analíticos. O plasma obtido nestes tubos é utilizado para determinação de parâmetros no laboratório de urgência, cujo resultado é obtido mais rapidamente que no caso dos tubos de soro, uma vez que não necessita de ocorrer a retração do coágulo para ser processado³⁰. Os técnicos de análises clínicas colhem as amostras de sangue para os tubos primários tendo em conta os parâmetros analíticos requisitados pelo clínico.

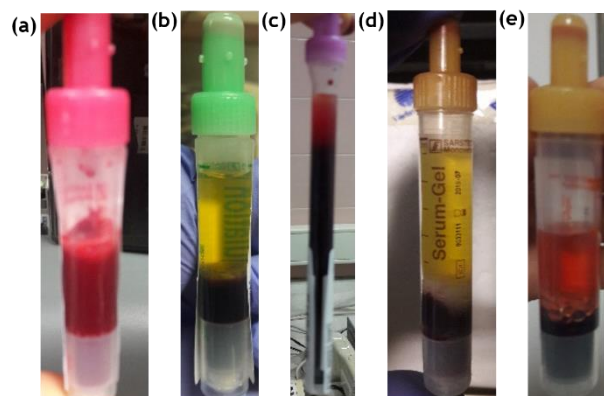


Figura 12. Tubos utilizados no laboratório. (a) Tubo de EDTA; (b e c) Tubo de citrato (tampa verde e roxa); (d) Tubo com gel separador; (e) Tubo de heparina-lítio.

Após o clínico realizar o pedido de análises, é gerado um código de barras único para cada doente que contém toda a informação demográfica, assim como os parâmetros analíticos a determinar e a data de colheita. Este código de barras é colocado em cada tubo

colhido e é lido pelos equipamentos, permitindo a estes comunicar os resultados ao *Modulab* de forma automatizada para, posteriormente, ser possível ver a ficha analítica completa.

2.3. Imunoquímica

Nesta secção determinam-se parâmetros analíticos como hormonas tiroideias e de fertilidade, marcadores cardíacos e tumorais, parâmetros bioquímicos e eletrólitos. Este laboratório está equipado com os seguintes analisadores: cobas® p 612, cobas® 6000, ARCHITECT™ i2000sr, Phadia® 250, centrífugas, ASSIST e HYDRASYS.

Os tubos de soro colhidos na central de colheitas e no internamento são entregues na secção pelos assistentes operacionais. Após sofrerem retração do coágulo, que demora cerca de 30 minutos, são centrifugados a 2500g durante 10 minutos a 20 °C, para que ocorra a separação física entre soro e células sanguíneas. De seguida, os tubos são colocados no equipamento pré-analítico, cobas® p 612 (Figura 13).

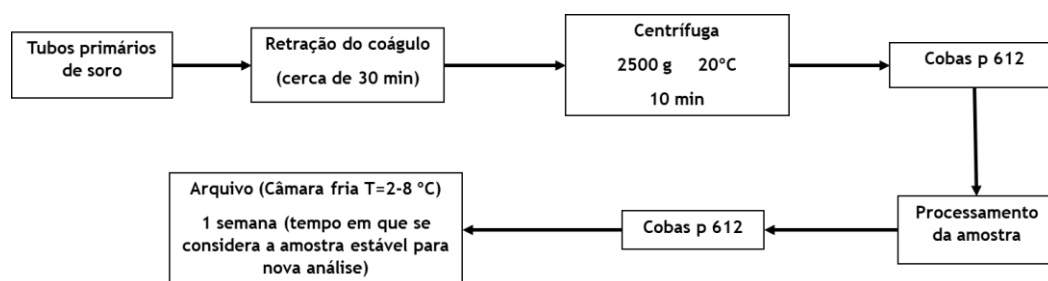


Figura 13. Esquema do fluxo de trabalho da secção Imunoquímica.

O equipamento cobas® p 612 (Figura 14) recebe os tubos e faz a sua triagem, através da leitura do código de barras, selecionando primeiro as análises prioritárias e, caso seja necessário, procede à sua alíquotagem³¹. Os tubos são distribuídos consoante os equipamentos onde são determinados os parâmetros analíticos requisitados. Após o processamento da amostra, o tubo volta a ser colocado para nova triagem no equipamento pré-analítico. Quando todas as análises solicitadas estiverem realizadas, os tubos são arquivados, sendo este arquivo numerado para facilitar a localização da amostra (Figura 13). Este equipamento está ligado ao *software Infinity*, que gere toda a informação que chega ao equipamento através do *software Modulab*, sejam os parâmetros requisitados ou a localização da amostra no arquivo.

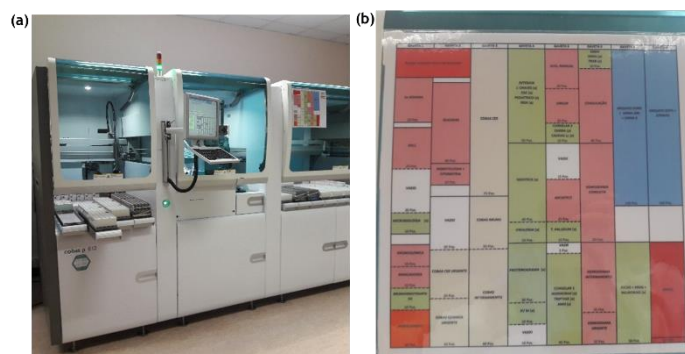


Figura 14. (a) Equipamento cobas® p612; (b) Mapa de distribuição.

2.3.1. Cobas® 6000

O equipamento cobas® 6000 (Figura 15) é composto por quatro módulos: unidade central, módulo c501 e dois módulos e601, ligado a um destilador de água. A unidade central ou *core* funciona como unidade de controlo para todos os módulos e é onde ocorre o carregamento e descarga das amostras. Tanto o módulo c501 (módulo de química clínica) como o módulo e601 (módulo de imunologia) têm a capacidade de detetar a integridade e o volume de amostra, repetir testes e realizar diluições³². Este analisador realiza determinações qualitativas e quantitativas *in vitro* de análises imunológicas e de química clínica em amostras de soro, plasma, urina, LCR, líquido pleural e líquido ascítico. Os parâmetros determinados neste equipamento encontram-se resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros biológicos determinados no equipamento cobas®6000.

Amostra	Parâmetros
Soro	Ácido úrico, Bilirrubina (direta e total), C3, C4, Cálcio, Creatina cinase, Cloro, Colesterol (HDL e LDL), Creatinina, Fosfatase Alcalina, Ferro, Fósforo, GGT, Glicose, AST, ALT, IgA, IgG, IgM, Magnésio, Proteína C Reativa, Potássio, Sódio, Transferrina, Ureia, Ferritina, PSA (total e livre), TSH, T3 e T4 livres, Folatos, Vitamina B12, Vitamina D, Paratormona, CA 19.9, CEA, CA 72.4, Tireoglobulina, Amicacina, Fator Reumatoide, Cadeias leves livres (K e lamda), α -1-antitripsina, Lipoproteína a, Haptoglobulina, Recetor solúvel da Transferrina, β -2-microglobulina, ECA
Soro/ Líquidos	Albumina, Amilase, Colesterol Total, Glicose, Lactato Desidrogenase, Lipase, Proteínas Totais, Triglicéridos, CA 125, CA 15.3, alfa feto-proteína
Urina	Proteínas totais, Microalbumina, Ureia, Creatinina, Ácido Úrico, Magnésio, Cálcio, Fósforo, Amilase
Urina/ LCR	Sódio, Potássio, Cloro, Glicose,
LCR	Proteínas Totais, IgG, Albumina



Figura 15. Equipamento cobas® 6000.

O **módulo c501** processa ensaios de química eléctrica e resulta da combinação de um eléctrodo seletivo a iões (ISE) com a unidade de análise fotométrica. As técnicas realizadas por este módulo são baseadas em ensaios fotométricos ou turbidimétricos/imunoturbidimétricos³². Os ensaios fotométricos utilizam a energia da luz transmitida ou absorvida para determinar a concentração de analitos, orgânicos ou inorgânicos, através de uma relação direta com a luz, determinada a um comprimento de onda específico. Exemplos deste ensaio são a espectrofotometria e a colorimetria, que podem ser utilizados para detetar complexos corados, determinar a concentração de analitos utilizando enzimas como

reagentes e ensaios enzimáticos. Nos ensaios turbidimétricos/imunoturbidimétricos, a concentração dos analitos é determinada pelo aumento da turbidez da amostra³⁰.

Os métodos espectrofotométricos baseiam-se no aumento ou na diminuição da absorvância a um determinado comprimento de onda, devido à formação de um complexo específico, que pode emitir cor ou não. Os parâmetros albumina, proteínas totais e bilirrubina são determinados por espectrofotometria, em que há formação de um complexo corado que é detetado por fotometria³⁰.

A concentração de um analito pode ser determinada utilizando a enzima que catalisa a sua degradação, isto é que utilize o analito como substrato para formar um produto. A concentração de uma enzima presente numa amostra pode ser determinada utilizando um substrato específico para a mesma. Ambos os métodos têm como princípio base a detecção do consumo de substrato ou a formação do produto de reação, que é traduzida pela taxa de oxidação de NADH, determinada a um comprimento de onda específico, que depende do analito-alvo. No caso de determinação da concentração de analito, é adicionada enzima ao soro, podendo ocorrer ou não a degradação do substrato. Este método é utilizado para detetar parâmetros analíticos como colesterol e glicose. No caso do ensaio enzimático, pretende-se determinar a concentração de uma enzima específica, para tal é adicionado ao soro um substrato específico para a enzima, podendo ocorrer a sua degradação e extrapolar-se a concentração da enzima. Este método é utilizado para determinar a concentração de enzimas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina³⁰.

O método ISE é um método eletroquímico que permite a determinação da concentração de iões específicos, utilizando um elétrodo e uma membrana permeável seletiva. Esta membrana permite a passagem de um único tipo de ião. O elétrodo, após a passagem da amostra pela membrana, determina a diferença de potencial gerada, traduzindo-a em concentração. Exemplo de parâmetros determinados por esta técnica são os iões sódio, potássio e cloro³⁰.

O funcionamento do **módulo e601** baseia-se no método de eletroquimioluminescência (ECLIA) e realiza ensaios baseados na técnica imunoturbidimetria, como detecção de marcadores tumorais, doseamento das hormonas tiroideias como hormona estimulante da tiroide (TSH), tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) livres e diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas através da pesquisa de anticorpos ou antigénios para VIH, vírus da hepatite B e vírus da hepatite C. Outros parâmetros determinados neste equipamento são ferritina, vitamina B12 e vitamina D³². O método ECLIA utiliza compostos eletroquímicos que geram luz electroquimicamente e participam no ciclo de reações de oxidação-redução. Este método utiliza micropartículas magnéticas revestidas com anticorpo ou antigénio que interage com o analito e, após a sua separação das micropartículas, é detetado por quimioluminescência³⁰.

2.3.2. Cobas® e 411

O equipamento cobas® e411 realiza imunoenaios com base na técnica de ECLIA, descrita acima, em amostras de soro ou plasma (Figura 16). Alguns dos testes realizados são o doseamento da pro-calcitonina, hormona anti-Mulleriana e proBNP. Este aparelho possui uma elevada sensibilidade e baixo tempo de resposta, sendo bastante útil em casos urgentes^{33,34}.



Figura 16. Equipamento cobas® e411.

2.3.3. ARCHITECT™ i2000sr

Os testes realizados no equipamento ARCHITECT™ (Figura 17) baseiam-se em reações antígeno-anticorpo, realizadas através da técnica de quimioluminescência (CLIA)³⁵. Este método utiliza substratos quimioluminescentes que reagem com várias enzimas. Estas funcionam como marcadores e o sinal obtido, em unidades relativas de luz (RLU), relaciona-se linearmente com a concentração do analito-alvo. O imunoenensaio de CLIA utiliza micropartículas revestidas com o anticorpo ou antígeno de interesse, como na técnica de ECLIA. O que diferencia ambas as técnicas são os substratos utilizados³⁰.



Figura 17. Equipamento ARCHITECT™ i2000sr.

Neste equipamento são doseados analitos como cortisol, hormonas da fertilidade (como progesterona, estradiol e testosterona) e marcadores cardíacos. São realizados testes para a deteção de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, anti-vírus da rubéola, anti-*Toxoplasma gondi*, anti-citomegalovírus (anti-CMV), anticorpo contra hepatite A, anticorpo anti-tireoperoxidase (anti-TPO) e anti-tireoglobulina (anti-Tg) e deteção do antígeno do vírus da hepatite C (VHC Ag). A determinação dos anticorpos contra a rubéola, toxoplasmose e CMV constituem as análises de infeções congénitas, isto é, infeções em que a probabilidade de

ocorrer transmissão de mãe para filho é elevada durante o período de gestação e que podem deixar sequelas no feto³⁰.

Neste equipamento é também realizado o teste de avidéz das IgG anti-CMV. A avidéz, por definição, é a força agregadora que numa mistura de moléculas liga anticorpos IgG policlonais a múltiplos epítomos de antígenos de proteínas. Os anticorpos IgG produzidos nos primeiros meses após a infeção exibem uma baixa avidéz, isto é, a ligação do anticorpo ao antígeno é fraca. Quanto maior o tempo decorrido após a infeção, maior a avidéz exibida pelos anticorpos IgG, ou seja, a ligação entre o anticorpo e o antígeno é mais forte. Este teste permite diferenciar uma infeção recente de uma infeção antiga³⁶.

2.3.4. Phadia® 250

O equipamento Phadia® 250 é utilizado para realizar testes de alergia e de autoimunidade, ensaios de ImmunoCAP e EliA respetivamente, tendo como base a técnica de ELISA por método indireto (Figura 18)³⁷. A técnica ELISA indireta baseia-se na reação anticorpo-antígeno, em que os antígenos presentes no poço de reação reagem com os anticorpos presentes na amostra. Esta reação é depois quantificada pela adição de um anticorpo secundário, anti-anticorpo primário, marcado com uma enzima, que quando adicionado o seu substrato gera um produto com fluorescência, ocorrendo uma reação colorimétrica que pode ser quantificada por fluorescência³⁸.

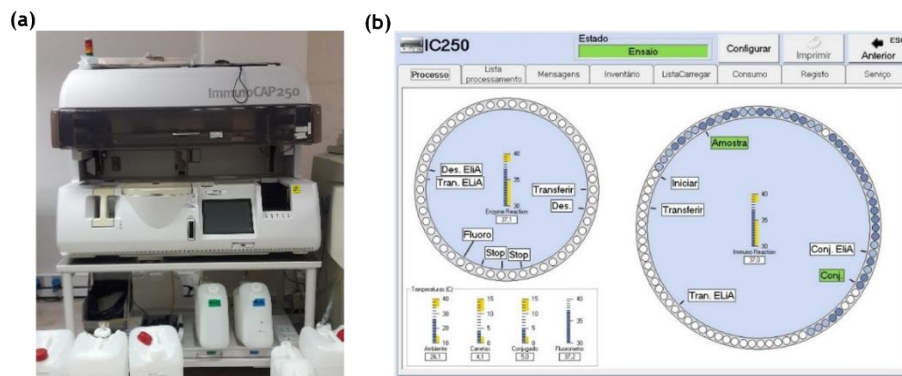


Figura 18. (a) Equipamento Phadia® 250; (b) Esquema do processo do equipamento.

A alergia é uma doença atópica específica causada pela reação do sistema imune quando sensibilizado com antígenos ambientais e caracteriza-se por uma reação de hipersensibilidade na qual ocorre inflamação do tecido ou do órgão. O diagnóstico é realizado pela determinação da imunoglobulina IgE, que geralmente se encontra aumentada em doenças atópicas. Esta imunoglobulina encontra-se presente no sangue (soro), na mucosa respiratória e gastrointestinal³⁰.

Outro teste que pode ser realizado é o doseamento da proteína calprotectina, para diagnóstico da doença inflamatória intestinal, através da técnica EliA. Esta técnica é um imunoenensaio enzimático com fluorescência e caracteriza-se por ser um ensaio “sandwich”, mais específico que o método indireto. Nesta técnica, o poço de reação está revestido com um anticorpo “de captura” com afinidade para o analito, neste caso a calprotectina, ligando-

se a esta. Após captura do analito, outro anticorpo (anticorpo primário) liga-se ao complexo analito-Ac de captura. Este anticorpo primário encontra-se conjugado com uma enzima e a sua quantificação é realizada pelo mesmo método que a técnica de ELISA indireta³⁹.

2.3.5. HYDRASYS

Os equipamentos ASSIST e HYDRASYS são utilizados para realização de proteinogramas e imunofixações (Figura 19). Ambas as técnicas têm como fundamento a separação das proteínas totais em função do seu peso molecular, por aplicação de uma carga elétrica, em cinco frações através das técnicas eletroforese e coloração. As cinco frações das proteínas são albumina, α_1 , α_2 , β e γ ³⁰. Estas técnicas podem efetuadas em soro ou urina.

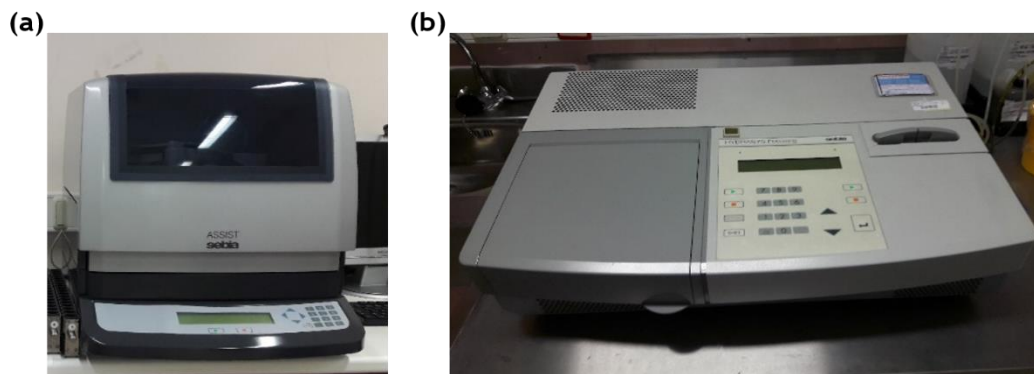


Figura 19. (a) Equipamento ASSIST; (b) Equipamento HYDRASIS.

O proteinograma tem como objetivo identificar os picos monoclonais, indicadores de patologias, enquanto que a imunofixação permite, além de identificar os picos monoclonais, identificar qual a cadeia da imunoglobulina que está aumentada³⁰. Em ambas as técnicas, a pipetagem das amostras para a câmara húmida é realizada pelo equipamento ASSIST. Seguidamente, é pipetado o controlo e o suporte dos pentes da câmara húmida que contém as amostras é colocado no equipamento HYDRASYS. Este equipamento tem dois compartimentos; no primeiro ocorre a eletroforese, em que as amostras são transferidas para o gel e ocorre a migração das frações das proteínas por aplicação de uma carga elétrica. A migração das proteínas ocorre do cátodo para o ânodo, devido à carga negativa das proteínas. Posteriormente, o gel é transferido para a outra câmara do equipamento, onde ocorre a coloração do gel; no caso do proteinograma o corante utilizado é o negro de amido, enquanto que na imunofixação utiliza-se o corante violeta ácido³⁰. Os géis de eletroforese são diferentes para cada técnica e, no caso da imunofixação, as amostras são diluídas.

As proteínas totais doseadas no soro dão informação sobre o estado geral do paciente. As proteínas mais abundantes no soro são: albumina, α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina, haptoglobina, β -lipoproteína, transferrina, C3, fibrinogénio e imunoglobulinas. A albumina é a proteína mais abundante do soro e confere informação acerca do estado nutricional, função hepática e renal, e permite também interpretar os níveis de cálcio e de magnésio, uma vez que se liga parcialmente a estes iões funcionando como proteína transportadora. A diferença entre a concentração de proteínas totais e a albumina determina a concentração das

globulinas. A relação entre estes três parâmetros permite manter a homeostase fisiológica, nomeadamente a nível da pressão osmótica. Uma alteração na relação entre a concentração da albumina e a concentração das globulinas gera uma alteração na homeostase, podendo originar uma patologia³⁰.

2.3.6. Técnicas de Biologia Molecular

Para realizar técnicas de biologia molecular utilizam-se os seguintes equipamentos: cobas® 4800, *MagNA Pure Compact*, *CFX96™ Real-Time System* e *C1000™ Thermal Cycle*.

O cobas® 4800 (Figura 20) é um equipamento completamente automatizado que realiza a extração e purificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) e a reação de PCR em tempo real, para a quantificação dos mesmos, num sistema de dois passos com os equipamentos cobas® x480 e cobas® z480⁴⁰. No cobas® x480 ocorre a extração dos ácidos nucleicos, por lise das células, e a sua purificação através de uma solução de micropartículas magnéticas, que têm grande afinidade para as moléculas de ácido nucleico, ligando-se a estas. As moléculas de ácido nucleico são, posteriormente, separadas das micropartículas magnéticas, ficando nos poços da placa de reação, sendo possível proceder à sua quantificação no equipamento cobas® z480^{30,40}. Este equipamento é um termociclador que controla a temperatura dos diferentes passos da reação de PCR em tempo real⁴⁰. Esta reação é constituída por três fases: desnaturação das cadeias de ácido nucleico, *annealing* dos *primers* e extensão. Os *primers* são marcados com um fluoróforo permitindo a sua quantificação por fluorescência³⁰. São utilizados três controlos (negativo, positivo baixo e positivo alto) com o objetivo de diminuir a zona cinzenta de quantificação de ácido nucleico. A quantificação dos controlos pode ser observada no gráfico do *software*, em tempo real. A quantificação de carga viral do vírus da imunodeficiência humana (VIH) e do vírus da hepatite C é realizada neste equipamento⁴⁰.

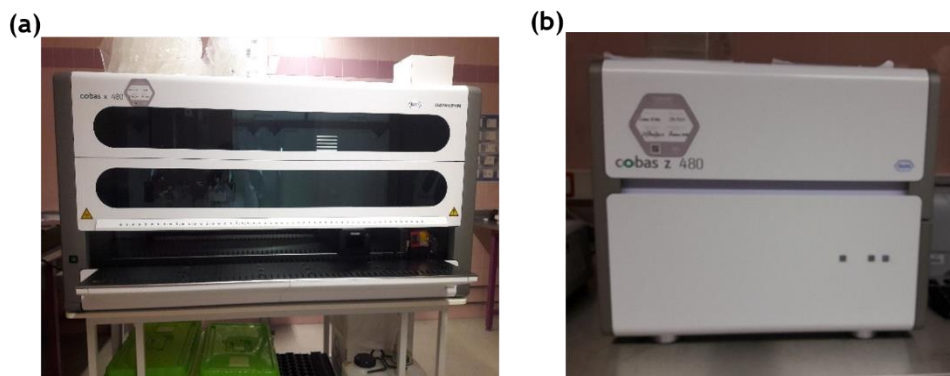


Figura 20. Equipamento cobas® 4800. (a) Equipamento cobas® x480; (b) Equipamento cobas® z480.

O equipamento *MagNA Pure Compact* (Figura 21a) realiza a extração de ácidos nucleicos em diversos tipos de amostras⁴¹, como as amostras de secreções nasais utilizadas em testes de identificação de vírus respiratórios. Após a extração dos ácidos nucleicos, é necessário a preparação da mistura de reação para a amplificação; esta inclui os pares de *primers*, a enzima para a reação de PCR (DNA polimerase, transcriptase reversa) na presença do seu cofator, buffer com pH ótimo para a atuação da enzima e nucleótidos. A maioria dos

vírus respiratórios são vírus de RNA e utilizam a enzima transcriptase reversa. A extração de ácido nucleico é constituída por quatro etapas: lise, ligação do material genético às micropartículas, remoção e lavagem dos detritos celulares, e eluição dos ácidos nucleicos purificados³⁰.

A identificação de vírus respiratórios é um teste sazonal e existem painéis pré-definidos, constituídos por uma mistura de *primers* que permitem identificar os vírus mais prevalentes numa determinada altura do ano. Os *primers* específicos para cada vírus constituinte de um painel estão marcados com fluoróforos diferentes, originando uma fluorescência e cor diferente, permitindo distinguir os diferentes vírus³⁰.

Nos equipamentos *CFX96™ Real-Time System* e *C1000™ Thermal Cycle* (Figura 21b) ocorre a reação de PCR *multiplex* em tempo real que permite a amplificação de várias sequências alvo presentes na mesma amostra. A interpretação desta reação baseia-se na avaliação do ponto *Cycle threshold* (Ct). O valor de Ct corresponde ao número do ciclo em que o sinal de fluorescência ultrapassa o valor basal, ou seja, corresponde ao início da fase exponencial (curva de fluorescência máxima)³⁰.

Quando está presente um vírus numa amostra, ocorrem os passos de PCR anteriormente descritos, ocorre ligação dos *primers* às moléculas de ácido nucleico viral, a enzima transcriptase reversa sintetiza a cadeia de DNA complementar (cDNA) marcada com fluoróforo e é detetada fluorescência, diretamente proporcional à concentração de moléculas de ácido nucleico viral³⁰. A identificação do vírus causador da infeção é realizada pela observação do valor de Ct para um determinado fluoróforo.

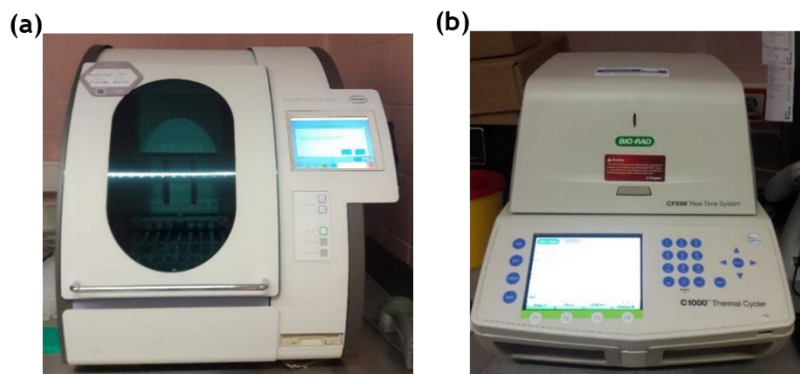


Figura 21. (a) Equipamento *MagNA Pure Compact*; (b) Equipamento *CFX96™ Real-Time System* e *C1000™ Thermal Cycle*.

2.3.7. *AUTIONMax* e *sediMax*

A análise urinária é constituída pela examinação física da amostra, como a cor e aparência, odor e volume, por “screening” químico e análise do sedimento. Esta análise tem como objetivo a deteção de disfunções do sistema renal, como cálculos urinários, proteinúria e cetonúria, e também o diagnóstico de infeção urinária, como no caso de se encontrarem leucócitos presentes na amostra³⁰.

O equipamento de análise urinária é constituído por dois módulos: *AUTIONMax* e *sediMax* (Figura 22)⁴². O módulo *AUTIONMax* realiza a análise sumária de urina⁴², isto é, uma

análise semi-quantitativa dos parâmetros de glicose, bilirrubina, proteínas, pH, leucócitos, urobilinogênio, sangue, cetonas e nitrito, utilizando a tira de reagente *Uriflet S*[®]. As tiras *Uriflet S*[®] são compostas por diversas áreas de reagentes, que permitem determinar os parâmetros referidos, e por uma área de calibração que permite eliminar as interferências causadas pela cor natural da urina (Tabela 6)⁴³. O resultado semi-quantitativo é dado por comparação da tira de reação com padrões *standard*.

Tabela 6. Princípio de reação da tira *Uriflet S* (adaptado de A. Menarini, 2016)⁴³.

Parâmetro	Princípio do teste
Glicose	Reação específica para glucose oxidase-peroxidase-cromogênio
Bilirrubina	A bilirrubina conjuga com sal de diazônio e origina uma coloração castanho-avermelhada
Proteínas	Reação de tetraclorofenoltetrabromossulfoftaleína com a proteína origina uma coloração verde devido à mudança do pH
pH	O indicador (bromocresol verde e bromoxilenol azul) reagem com os íons H ⁺ e alteram a cor entre pH = 4,5 - 9
Leucócitos	Deteção baseada na atividade da esterase nos leucócitos
Urobilinogênio	Urobilinogênio conjuga com um sal de diazônio e origina uma coloração castanho-avermelhada
Sangue	Deteção da atividade da pseudoperoxidase da hemoglobina Mais sensível ao pigmento (hemoglobina) e à mioglobina do que aos eritrócitos A ação da pseudoperoxidase da hemoglobina e da mioglobina catalisa o indicador (hidroperóxido) originando uma coloração azul/ verde
Cetonas	Baseada no teste Legal Mais sensível ao ácido acetoacético que à acetona
Nitrito	Princípio da reação de Griess Reage unicamente com o nitrito; identifica o nitrito e as bactérias formadoras de nitrito por uma coloração rosa/ vermelha

O módulo *sediMax* realiza a análise do sedimento, uma análise quantitativa que consiste na visualização do sedimento ao microscópio, incorporado no equipamento. Este módulo compara a amostra com um controle para que a análise seja viável⁴². Estes dois aparelhos estão interligados⁴² e, no caso de os resultados não estarem em concordância, têm de ser confirmados pelo método tradicional, que consiste na observação do sedimento ao microscópio ótico.



Figura 22. Equipamento *AUTIONMax* e *sediMax*.

2.3.8. Testes manuais

Existem ainda alguns parâmetros que não são determinados por métodos automatizados, como tal, são determinados por método manual. São exemplos deste caso a pesquisa de *Coxiella burnetii* e de *Rickettsia conorii* e os testes rápidos de gravidez e drogas de abuso.

A pesquisa de microrganismos como *Coxiella burnetii*, causadora da febre Q, e *Rickettsia conorii*, um agente casual mediterrânico que causa febre *Boutonneuse*, vulgarmente conhecida como febre da carraça, é feita por imunofluorescência indireta (IFA). Esta pesquisa tem como objetivo detetar anticorpos IgG e IgM específicos para o microrganismo. A técnica de IFA é o método mais indicado e sensível para detetar a resposta IgM^{30,44,45}.

Esta técnica baseia-se na reação de anticorpos específicos presentes na amostra com os antígenos que revestem os poços da lâmina, em que as ligações não específicas são eliminadas por lavagem. Posteriormente, adiciona-se uma globulina anti-humana marcada com fluoresceína, que identifica os complexos anticorpo-antígeno, que são depois observados ao microscópio de fluorescência^{44,45}. A diferença na pesquisa destes dois microrganismos é que no caso da *Coxiella burnetii* existe distinção entre fase I e fase II na lâmina, representando a fase crónica e fase aguda, respetivamente⁴⁴.

Neste laboratório realizam-se testes de gravidez, testes rápidos de drogas de abuso e deteção de sangue oculto nas fezes utilizando um ensaio imunocromatográfico. Estes testes permitem determinar a presença de um determinado analito na amostra por reação entre anticorpo e antígeno, que ocorre na “cassete-teste”. A “cassete-teste” é constituída por uma membrana de nitrocelulose, onde, no ponto de controlo, se encontra o anticorpo conjugado específico liofilizado para o analito-alvo marcado com uma enzima, e no ponto teste está presente um antígeno ou anticorpo, ambos fixos na membrana. Quando a amostra entra em contacto com a membrana o anticorpo conjugado é hidratado e flui com a amostra até ao fim da membrana de nitrocelulose. O anticorpo conjugado é sempre detetado no ponto de controlo, permitindo assegurar que as condições da reação e da técnica são as corretas. A linha controlo é o ponto-chave para a viabilidade do teste. No ponto teste é apenas detetado o analito alvo (Figura 23)⁴⁶. Neste ponto o aparecimento ou não de coloração depende do tipo de teste que se realize, rastreio de drogas de abuso ou teste de gravidez.



Figura 23. Princípio do teste imunocromatográfico (adaptado de *Sebastian C. et al.*, 2016)⁴⁶.

No caso dos testes rápidos de drogas utiliza-se um ensaio imunocromatográfico competitivo para detetar a presença do metabolito da droga em questão na amostra. No ponto teste encontra-se um antígeno e no ponto controlo encontra-se um anticorpo

secundário, com capacidade de reagir com o anticorpo conjugado presente na membrana. Na presença do metabolito, quando a amostra é colocada na “cassete-teste”, ocorre conjugação do metabolito com um anticorpo marcado pré-imobilizado na membrana e forma-se um complexo apenas detetável no ponto controlo. O resultado desta reação confirma o consumo da droga, uma vez que apenas é possível visualizar uma linha (ponto controlo). No caso de ausência do metabolito, o anticorpo conjugado é detetado no ponto teste e no ponto controlo, são observadas duas linhas (teste e controlo) que determinam o resultado negativo⁴⁶. Estes testes são maioritariamente utilizados para controlo de consumo de drogas ou para monitorização da terapêutica prescrita com psicofármacos.

No caso do teste de gravidez, é realizado um ensaio “sandwich” em que se pretende detetar a fração beta da hormona gonadotrofina coriónica humana (β -hCG), que se encontra aumentada na gravidez e é excretada na urina. Se esta hormona estiver presente na amostra, a fração beta interage com o anticorpo anti- β -hCG, que está imobilizado no ponto teste da membrana, originando uma reação colorimétrica que permite visualizar duas linhas (teste e controlo), confirmando a gravidez. No caso de a hormona não estar presente na amostra, não ocorre reação no ponto teste e apenas se visualiza reação colorimétrica no ponto de controlo, sendo o resultado negativo⁴⁶.

A pesquisa de sangue oculto é realizada por teste imunocromatográfico qualitativo em caso de suspeita de doença gastrointestinal, como cancro colorretal, úlceras, fissulas, diverticulite, colite e pólipos. Este rastreio é realizado por intermédio de um teste imunocromatográfico em formato “sandwich” no qual se pretende detetar hemoglobina. No ponto teste da membrana de nitrocelulose está imobilizado um anticorpo anti-hemoglobina; quando a hemoglobina está presente na amostra vai interagir com os anticorpos imobilizados no ponto teste e ocorre uma reação colorimétrica que determina o resultado positivo. A ausência de cor no ponto teste indica um resultado negativo³⁰.

2.4. Hematologia

A Hematologia é a área clínica que estuda as células sanguíneas e a coagulação. Este estudo requer a determinação da concentração, estrutura e função das células no sangue, dos seus precursores na medula óssea e de alguns parâmetros no plasma ou soro, como por exemplo a ferritina e a vitamina B12. Engloba também a avaliação da função das plaquetas e das proteínas envolvidas na coagulação sanguínea³⁰.

No laboratório de Hematologia analisam-se as células sanguíneas através de hemograma, leucograma e estudo da hemostase. Estes parâmetros são fundamentais para avaliar o estado do doente, sobretudo em casos de anemia e de deficiência nas vias de coagulação³⁰. Para a realização destes parâmetros encontram-se disponíveis na secção os seguintes equipamentos: ACL TOP, Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER, ADAMS® A1c HA-8180T, INNOVANCE PFA-200, AEROSPRAY, Sediplus® S 2000, um citómetro de fluxo e dois microscópios óticos.

2.4.1. Hematimetria

Todas as células sanguíneas derivam das células-tronco pluripotentes presentes na medula óssea, pelo processo de eritropoiese, e dividem-se em três tipos principais: eritrócitos, leucócitos e plaquetas⁴⁷.

Os **eritrócitos** são especializados no transporte de oxigênio e dióxido carbono entre os pulmões e os tecidos e têm um tempo de semi-vida periférica de 120 dias⁴⁷.

Os **leucócitos** são compostos por fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos) e por linfócitos. Os fagócitos têm como função proteger contra infecções bacterianas e fúngicas. No grupo dos linfócitos distinguem-se as células B, envolvidas na produção de anticorpos, e as células T (CD4 auxiliares e CD8 supressores); estas células estão relacionadas com a resposta imune e com a proteção contra vírus e células estranhas ao organismo. O tempo de semi-vida dos leucócitos varia consoante o seu tipo, podendo ser de horas, semanas ou anos (Tabela 7)⁴⁷.

As **plaquetas** são as células mais pequenas do sangue e têm um papel fundamental na manutenção da hemostase. O seu tempo de semi-vida no sangue é de apenas 10 dias. A principal função das plaquetas é a formação do coágulo plaquetário durante a resposta hemostática. Esta função pode ser dividida em adesão (interação das plaquetas com as paredes dos vasos sanguíneos), agregação (interação entre plaqueta-plaqueta) e libertação^{47,48}.

Tabela 7. Células sanguíneas (adaptado de Hoffbrand A.V. et al., 2018)⁴⁷.

Célula	Diâmetro (µm)	Tempo de semi-vida no sangue	Função
Eritrócitos	6 - 8	120 dias	Transporte de oxigênio e dióxido de carbono
Plaquetas	0,5 - 3	10 dias	Hemostase
Fagócitos			
• Neutrófilos	12 - 15	6 - 10 horas	Proteção contra fungos e bactérias
• Monócitos	12 - 20	20 - 40 horas	
• Eosinófilos	12 - 15	Dias	Proteção contra parasitas
• Basófilos	12 - 15	Dias	
• Linfócitos B e T	7 - 9 (em repouso) 12 -20 (ativos)	Entre semanas a anos	Células B: síntese de imunoglobulinas Células T: proteção contra vírus; função imune

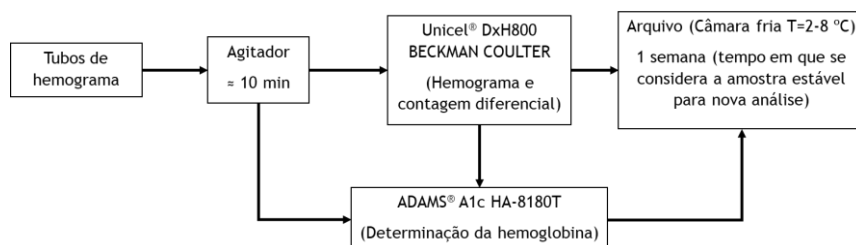


Figura 24. Esquema do fluxo de trabalho dos tubos de hemograma.

Na secção de Hematologia são processadas as amostras de sangue total colhidas em tubos com EDTA (Figura 12a) e as amostras de plasma colhidas em tubos com tampa verde e roxa (Figura 12b e 12c), ambos com citrato. Os tubos de hemograma após serem separados no equipamento pré-analítico (Capítulo 2.3.) são agitados durante 10 minutos, sendo depois processados no equipamento de acordo com o pedido clínico (Figura 24).

O hemograma divide-se em eritrograma, leucograma e plaquetograma, permite avaliar as três séries celulares e é realizado no equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER. No eritrograma (Tabela 8) é determinado o número de eritrócitos, em contagem absoluta, a hemoglobina, o hematócrito, os índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) e a dispersão do volume eritrocitário (RDW). No eritrograma é também determinada a contagem de reticulócitos, células imaturas da linhagem eritróide, que correspondem ao estado imediatamente anterior ao eritrócito. No leucograma (Tabela 9) é determinada a contagem absoluta de leucócitos e a contagem diferencial, absoluta e em percentagem, dos diferentes tipos de leucócitos. No plaquetograma (Tabela 10) determina-se a contagem absoluta das plaquetas, o volume plaquetar médio (VPM) e a dispersão do volume plaquetar (PDW)⁴⁹.

Tabela 8. Parâmetros do eritrograma.

Eritrograma	Hemoglobina (Hb)	Avalia a concentração de hemoglobina no sangue
	Hematócrito (Ht)	Determina o volume sanguíneo ocupado pelos eritrócitos
		Avalia o tamanho dos eritrócitos
	VCM	Classifica as anemias em microcítica, normocítica e macrocítica
	HCM	Avalia o conteúdo de hemoglobina presente nos eritrócitos
	CHCM	Avalia a concentração de hemoglobina presente nos eritrócitos Classifica as anemias em hipocrômica e normocrômica
	RDW	Avalia a morfologia dos eritrócitos (variação do tamanho)
	RET	Contagem de reticulócitos Avalia a eritropoiese
	IRF	Contagem de reticulócitos corrigida com o hematócrito
	RVM	Avalia o tamanho dos reticulócitos

Tabela 9. Parâmetros do leucograma.

Leucograma		Contagem de leucócitos
WBC		Aumento da contagem = leucocitose
		Diminuição da contagem = leucopenia
UWBC		Contagem dos leucócitos corrigida
Neutrófilos		Aumento do nº absoluto = neutrofilia
		Diminuição do nº absoluto = neutropenia
Linfócitos		Aumento do nº absoluto = linfocitose
		Diminuição do nº absoluto = linfopenia
Monócitos		Aumento do nº absoluto = monocitose
Eosinófilos		Aumento do nº absoluto = eosinofilia
		Diminuição do nº absoluto = eosinopenia
Basófilos		Aumento do nº absoluto = basofilia

Tabela 10. Parâmetros do plaquetograma.

Plaquetograma		Contagem de plaquetas
PLT		Aumento do nº de plaquetas = trombocitose
		Diminuição do nº de plaquetas = trombocitopenia
VPM		Determina o volume ocupado pelas plaquetas
PDW		Avalia a morfologia das plaquetas

Todos os parâmetros referidos nas tabelas são determinados no equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER (Figura 25). Este equipamento é um contador automático que utiliza a técnica de citometria de fluxo modificada, mediada por volume, condutividade e dispersão da luz, e permite a análise individualizada das células em amostras de sangue total com EDTA e noutras amostras biológicas, como líquido ascítico e líquido pleural. Esta análise caracteriza a célula individualmente por tamanho, complexidade, forma e estrutura, permitindo a diferenciação das células sanguíneas e a deteção das células vermelhas nucleadas⁴⁷.

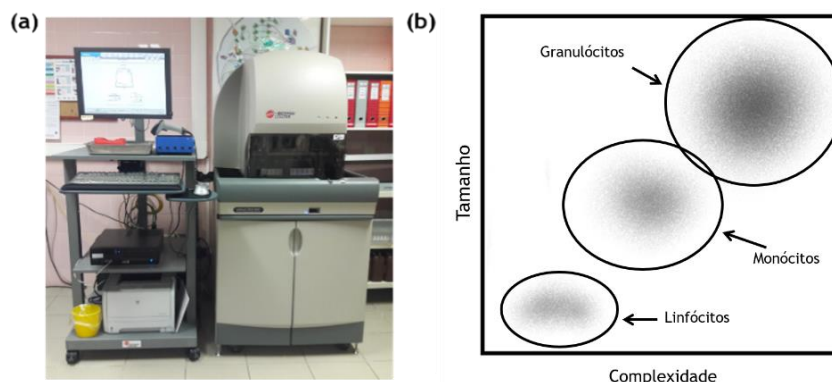


Figura 25. (a) Equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER; (b) Parâmetros celulares (tamanho vs complexidade) por citometria de fluxo (adaptado de Murray P.R. et al., 2016)⁵⁰.

2.4.1.1. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) define-se pela diferença de altura, medida em milímetros, entre a superfície da coluna de líquido total e a superfície de sedimentação dos glóbulos vermelhos. A amostra é misturada com anticoagulantes e é sedimentada pela força

da gravidade. A medição da diferença de altura é realizada por um feixe de luz, que atravessa a amostra e atinge um detetor onde é detetada a mudança de intensidade da luz que atravessa a amostra, e ocorre num período de 60 minutos (Figura 26b)³⁰. A velocidade de sedimentação dos eritrócitos é realizada no equipamento Sediplus® S 2000 DESAGA (Figura 26a).

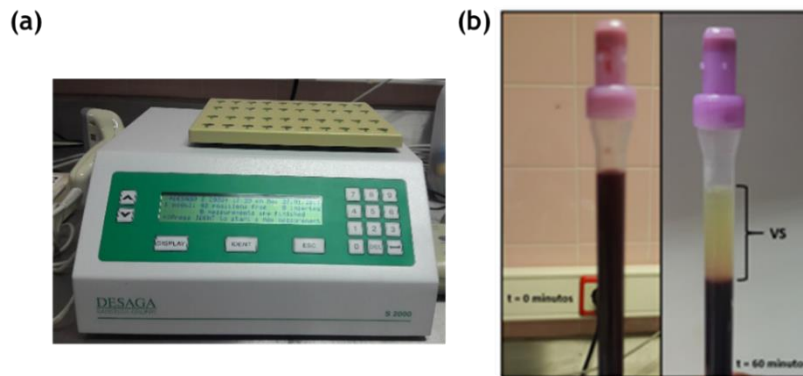


Figura 26. (a) Equipamento Sediplus® S 2000 DESAGA; (b) Diferenças entre os 0 e 60 minutos.

O estudo da VS é útil no diagnóstico e na monitorização não-específica de doenças como arterite temporal, polimialgia reumática e no linfoma de Hodgkin. A velocidade de sedimentação aumenta com a idade e pode estar aumentada em doenças inflamatórias sistémicas, neoplasias e na gravidez. A VS depende principalmente da concentração de proteínas plasmáticas e de moléculas proteicas, como o fibrinogénio e imunoglobulinas⁴⁸.

2.4.1.2. Esfregaço sanguíneo e colorações citoquímicas

O estudo morfológico do sangue periférico deve ser realizado sempre que a clínica ou qualquer alteração inesperada nas contagens e/ou nos respetivos índices hematimétricos o sugiram⁴⁹. Os esfregaços (Figura 27a) devem ser efetuados até 2 horas após a colheita, no caso de sangue venoso anticoagulado com EDTA, e imediatamente após a colheita no caso de sangue capilar e medular. Os esfregaços devem ser corados até 1 horas após a secagem.

Os esfregaços de sangue periférico são corados no equipamento AEROSPRAY (Figura 27b). Este equipamento utiliza como técnica de coloração a técnica de May-Grünwald-Giemsa modificada. Os esfregaços de medula óssea são corados manualmente, utilizam-se duas colorações: a coloração de May-Grünwald-Giemsa e a coloração de Perls.

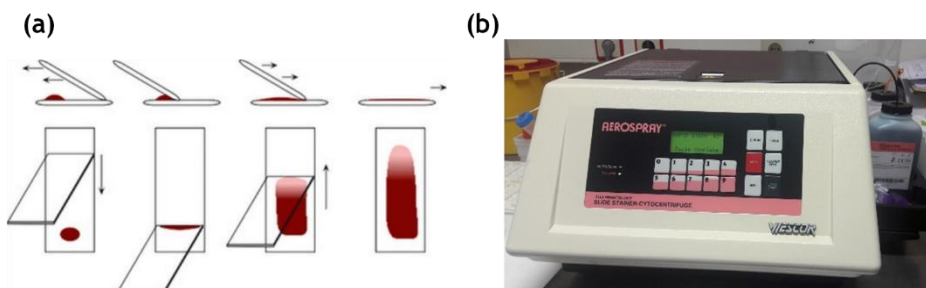


Figura 27. (a) Procedimento do esfregaço sanguíneo⁵¹; (b) Equipamento AEROSPRAY.

A coloração de May-Grünwald-Giemsa é utilizada para corar as células sanguíneas. O corante de May-Grünwald contém eosina e azul de metileno em álcool metílico e é utilizado como fixador; o corante de Giemsa contém eosina e derivados de azul de metileno. A combinação destes dois corantes permite a coloração de todas as estruturas celulares (Tabela 11; Figura 28a). A coloração de Perls e a coloração May-Grünwald-Giemsa são utilizadas como contra-colorações para examinar a morfologia celular em detalhe⁵².

Tabela 11. Coloração de May-Grünwald-Giemsa.

Estrutura celular		Coloração May-Grünwald-Giemsa
Núcleo		Vermelho-violeta
Citoplasma	Basófilo	Azul
	Acidófilo	Tom rosado
	Neutrófila	Castanho
Granulações específicas	Eosinófila	Laranja
	Basófila	Violeta escuro
	Azulófila	Rosa-púrpura
Hemácias/ eritrócitos		Rosa-púrpura com ponteados basófilos (azul cobalto)

A coloração de Perls tem como objetivo detetar o ferro iónico (Fe^{3+}) presente nas células. No decorrer da reação com azul da Prússia, o ferro iónico do grupo heme reage em solução de ácido clorídrico (HCl) com o hexocianeto (II) de potássio e precipita na forma de um complexo de sal insolúvel, com coloração azul, nos eritrócitos e noutras células, tanto na medula como nos tecidos, permitindo localizar o ferro livre celular. A solução “Nuclear Fast Red” permite corar os precipitados de ferro ao nível do citoplasma, com uma coloração ligeiramente rosada (Figura 28b)⁵².

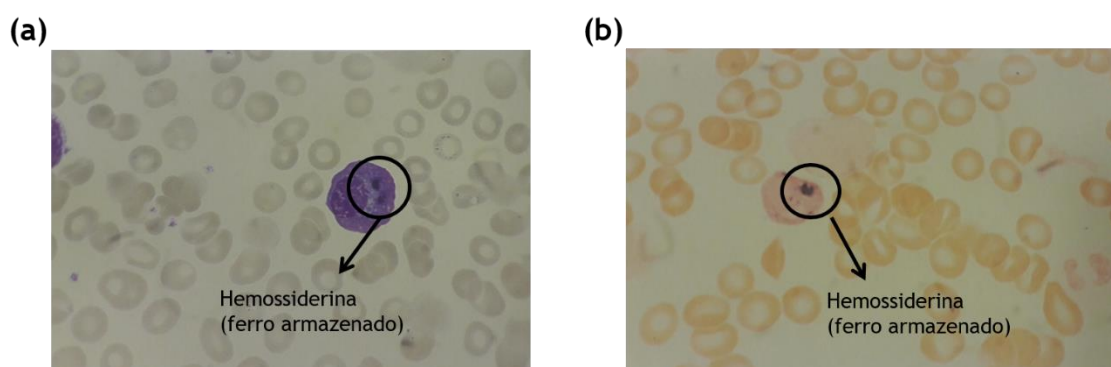


Figura 28. (a) Lâmina corada pela coloração de May-Grünwald-Giemsa; (b) Lâmina corada pela coloração de Perls (adaptado de *Bain B.J. et al., 2010*)⁵².

2.4.2. Hemoglobina glicada

A hemoglobina (Hb) é uma proteína especializada em executar as trocas gasosas que ocorrem nos eritrócitos. A hemoglobina é constituída por um tetrâmero de cadeias de globina e cada cadeia está ligada a um grupo heme (Figura 29). O sangue de um adulto contém moléculas de hemoglobina A (Hb A), sendo este o tipo de hemoglobina predominante, hemoglobina fetal (Hb F) e HbA2, ambas em menor concentração (Tabela 12)⁴⁸.

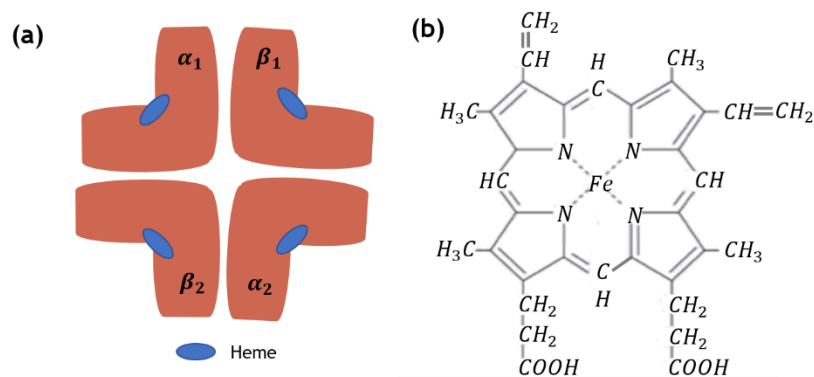


Figura 29. (a) Estrutura da molécula de hemoglobina; (b) Estrutura do grupo heme (adaptado de Hoffbrand A.V. *et al.*, 2013)⁴⁸.

Tabela 12. Hemoglobinas mais frequentes no sangue.

HbA	HbA ₂	HbF
- Constituída por quatro cadeias polipeptídicas: $\alpha_2\beta_2$.	- Constituída por quatro cadeias polipeptídicas: $\alpha_2\delta_2$.	- Constituída por quatro cadeias polipeptídicas: $\alpha_2\gamma_2$.
- Hemoglobina dominante após 3-6 meses de vida.	- Pequenas quantidades no adulto.	- Mudança de hemoglobina fetal para hemoglobina adulta ocorre entre 3 a 6 meses após o nascimento.
- Hemoglobina predominante no adulto.		- Pequenas quantidades no sangue adulto.

A hemoglobina glicada (HbA1c) resulta de uma reação não enzimática irreversível que ocorre entre as moléculas de glicose circulantes no sangue e os grupos amina livres presentes na hemoglobina dos eritrócitos, denominada por glicação. A glicação da hemoglobina depende da concentração de glicose no sangue ao longo do tempo de semi-vida dos eritrócitos (120 dias). Devido a esta característica, a hemoglobina glicada é considerada um indicador com grande utilidade clínica que reflete a concentração média de glicose no sangue nos 120 dias antes da colheita de sangue. A sua determinação pode ser afetada pela presença de hemoglobinopatias^{30,53}.

A hemoglobina glicada (HbA1c, HbA2) e a hemoglobina fetal (HbF) são analisadas no equipamento ADAMS® A1c HA-8180T pela técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com base na cromatografia de troca catiónica de fase reversa (Figura 30a). Este equipamento consegue detetar a presença de hemoglobina S, C, E e D, outras variantes da hemoglobina⁵⁴. A hemoglobina glicada é utilizada principalmente no diagnóstico e na monitorização de pacientes diagnosticados com diabetes³⁰. A avaliação da hemoglobina fetal é bastante útil no diagnóstico de doenças como a talassémia⁴⁸.

A **hemoglobina S** é formada durante o processo de hemólise oxidativa e caracteriza-se por uma mistura de formas no estado oxidativo e parcialmente desnaturadas da molécula de hemoglobina. A hemoglobina S não tem capacidade de transportar oxigénio mas consegue combinar-se com o monóxido de carbono. Esta hemoglobina tem importância clínica em situações de cianose enterogénica³⁰.

A **hemoglobina C** é sobretudo encontrada em indivíduos de descendência africana. Esta hemoglobina tem tendência para formar cristais romboides nos eritrócitos e a sua presença está associada a quadros clínicos de anemia hemolítica e a traços de drepanocitose

e β -talassémia. A **hemoglobina E** é mais frequente em indivíduos do sudoeste asiático, está associada a anemia hipocrômica microcítica leve e está associada ao traço β -talassémico (assemelha-se à talassémia *major*). A **hemoglobina D** está associada a anemia hemolítica leve⁴⁸.

Na técnica de HPLC de troca catiónica de fase reversa a amostra é injetada num fluido líquido (fase móvel) que interage com a coluna cromatográfica hidrofóbica (fase estacionária) através dos seus ligandos. As moléculas de hemoglobina interagem com a coluna hidrofóbica (apolar) através das regiões hidrofóbicas da molécula e ligam-se. A eluição das moléculas de hemoglobina ocorre por intermédio do eluente utilizado; as moléculas são eluídas por ordem decrescente de polaridade. As moléculas de hemoglobina são detetadas por método colorimétrico a dois comprimentos de onda (420 e 500 nm) após a sua eluição. O detetor, localizado no final da coluna de cromatografia, identifica as moléculas que são eluídas através do tempo de retenção de cada molécula e traduz os dados no cromatograma, por comparação com tempos de retenção *standard*, que permite visualizar a concentração do analito e o pico de eluição (Figura 30b). O tempo de retenção corresponde ao tempo que decorre desde a injeção do tampão de eluição até que o analito de interesse seja detetado/eluído^{55,56}.

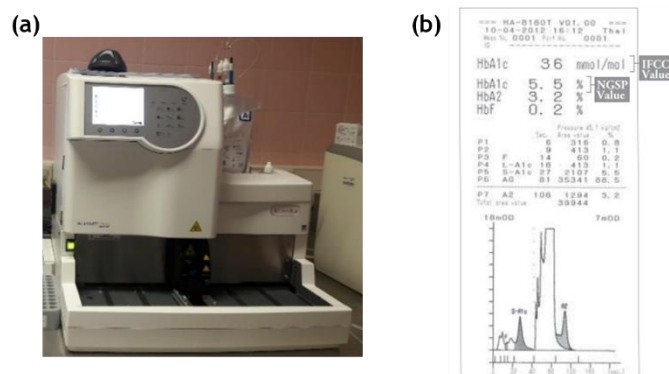


Figura 30. (a) Equipamento ADAMS® A1c HA-8180T; (b) Cromatograma⁵⁴.

2.4.3. Hemostase

A hemostase divide-se em hemostase primária, hemostase secundária ou coagulação e fibrinólise. Na hemostase primária ocorre a contração imediata dos vasos sanguíneos, as plaquetas aderem às paredes dos vasos mediadas pelo Fator de von Willebrand (FvW), terminando na agregação das plaquetas e na formação de um trombo plaquetar instável, que permite estancar e controlar, temporariamente, a hemorragia (Figura 31). Na hemostase secundária ocorre a conversão do fibrinogénio em fibrina, sendo este processo mediado pela trombina formada no local da lesão. A fibrinólise consiste na digestão do trombo plaquetar e ocorre a conversão do plasminogénio em plasmina. A fibrinólise é estimulada pela Proteína C ativada e pela Proteína S, e é inibida indiretamente pela trombina⁴⁸.

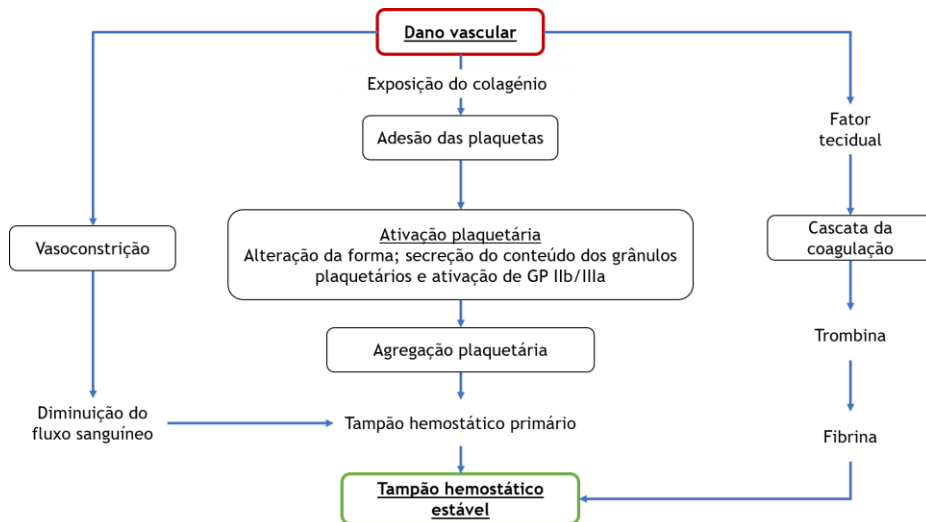


Figura 31. Processo de hemostase (adaptado de Hoffbrand A.V. et al., 2018)⁴⁷.

A resposta hemostática normal depende da interação entre a parede vascular, as plaquetas circulantes e os fatores de coagulação do sangue. Este mecanismo, eficiente e rápido, é essencial à vida para controlar hemorragias nos locais onde ocorreu lesão vascular. Os principais componentes envolvidos no mecanismo de hemostase são os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores de coagulação (Figura 32), os inibidores da coagulação e os componentes do mecanismo fibrinolítico⁴⁸.

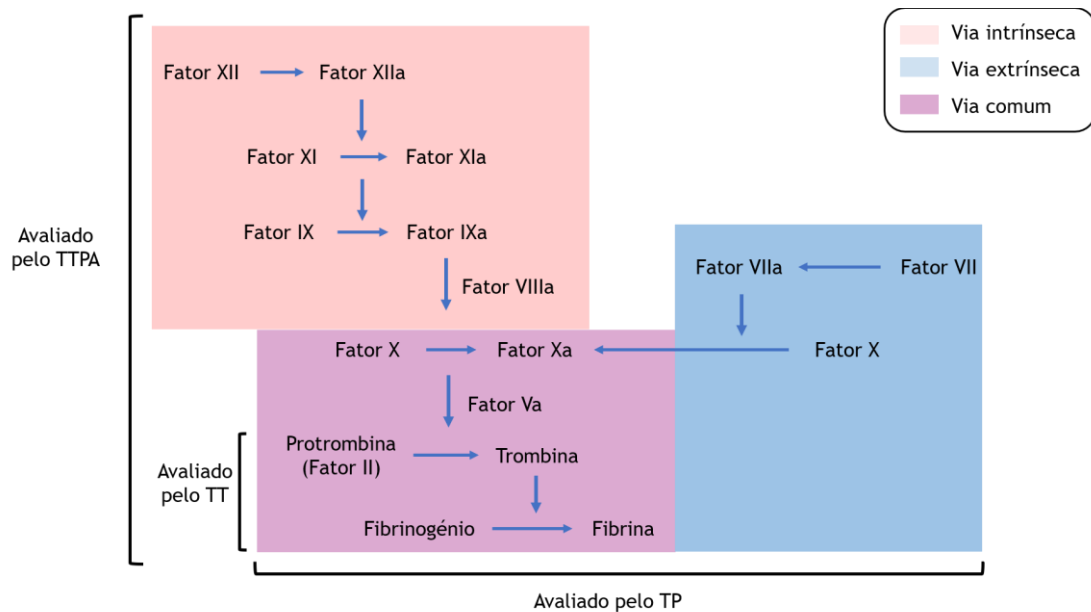


Figura 32. Cascata da coagulação (adaptado de Hoffbrand A.V. et al., 2018)⁴⁷.

2.4.3.1 Hemostase primária

Para avaliar a hemostase primária realizam-se estudos de função plaquetária e testes de agregação, no equipamento INNOVANCE PFA-200 (Figura 33a). Este equipamento utiliza cartuchos com colagénio/ADP e colagénio/epinefrina, onde é colocada a amostra de sangue total ou de sangue com citrato. O sangue é aspirado e depositado na membrana, revestida com colagénio e iniciando-se o processo de adesão plaquetária. A epinefrina e o ADP ativam

as plaquetas, induzindo a libertação dos conteúdos dos grânulos plaquetários, o que permite a formação do trombo plaquetário no orifício e diminuir o fluxo sanguíneo (Figura 33b). Este sistema determina o tempo de oclusão, isto é, o tempo que decorre desde o início do teste até à oclusão do orifício do cartucho; este tempo é indicativo da função plaquetária da amostra⁴⁸.

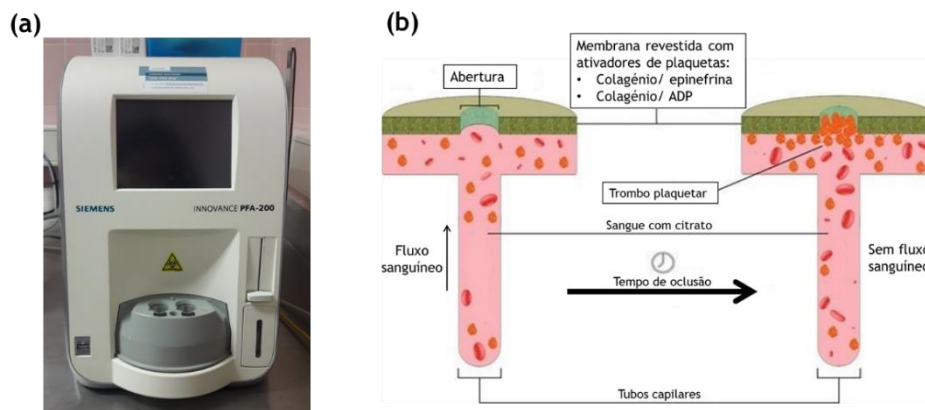


Figura 33. (a) Equipamento INNOVANCE PFA-200; (b) Princípio do teste da hemostase primária (adaptado de Casso G. *et al.*, 2015)⁵⁷.

2.4.3.2. Hemostase secundária

No processo de hemostase secundária ou coagulação ocorre a cascata da coagulação (Figura 32), que se divide em três vias: via intrínseca, via extrínseca e via comum. Os testes da função hemostática incluem o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de trombina (TT), determinação específica dos fatores de coagulação e do Fator de von Willebrand⁴⁸. Todos os parâmetros descritos são realizados no equipamento ACL TOP (Figura 34). Esse equipamento realiza técnicas de fotometria e de turbidimetria/imunoturbidimetria. Neste equipamento doseiam-se também os inibidores da coagulação (antitrombina (AT), proteína C (PC) e proteína S livre (PS)), anticoagulante lúpico (AL), D-dímeros e fibrinogénio. As amostras de sangue são colhidas para tubos de citrato (tampa verde) destinados ao estudo da coagulação (TTPA, TP e fatores de coagulação) e são centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos.



Figura 34. Equipamento ACL TOP.

Estes parâmetros são analisados por ensaios turbidimétricos/imunoturbidimétricos, que se baseiam na turbidez da amostra, ou por ensaios colorimétricos, através da determinação de um complexo corado num determinado comprimento de onda (Tabela 13). Estas técnicas encontram-se descritas no subcapítulo 2.3.1.

Tabela 13. Técnicas utilizadas para a determinação dos parâmetros no equipamento ACL TOP.

Método de deteção	Parâmetros	Gráfico
Turbidimetria	TP, TTPA, Fatores (II, V VII, VIII, IX, X, XI, XII), TT	Gráfico Coagulométrico
Imunoturbidimetria	Proteína S, FvW, D-dímero, Fator XIII	Gráfico Imunoturbidimétrico
Fotometria	Proteína C, Fator VIII, Antitrombina	Gráfico de substratos cromogénicos

O **tempo de protrombina (TP)** avalia a via extrínseca da coagulação e é expresso através do Rácio Internacional Normalizado (INR). Neste teste utiliza-se tromboplastina tecidular e cálcio, que ao contactarem com o plasma do doente ativam a via extrínseca da coagulação. Quando se verifica um TP prolongado pode ser indicativo de deficiência dos fatores VII, X, V, protrombina (fator II) ou fibrinogénio, doença hepática, terapia com anticoagulante oral ou coagulação intravascular disseminada⁴⁸.

O **tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)** avalia a via intrínseca da coagulação. Este teste utiliza um ativador de contacto, cloreto de cálcio e fosfolípidos sintéticos que ativam esta via quando adicionados ao plasma do doente. O prolongamento do TTPA pode ser devido a défice nos fatores VIII, IX, XI e XII, X, V, protrombina ou fibrinogénio, doenças hepáticas, défice de vitamina K, presença de heparina, de anticoagulante lúpico ou de outros inibidores (Figura 35). Uma prolongação no TP e no TTPA, simultaneamente, é indicativo de deficiência de fatores da via comum (fatores II e V)⁴⁸.

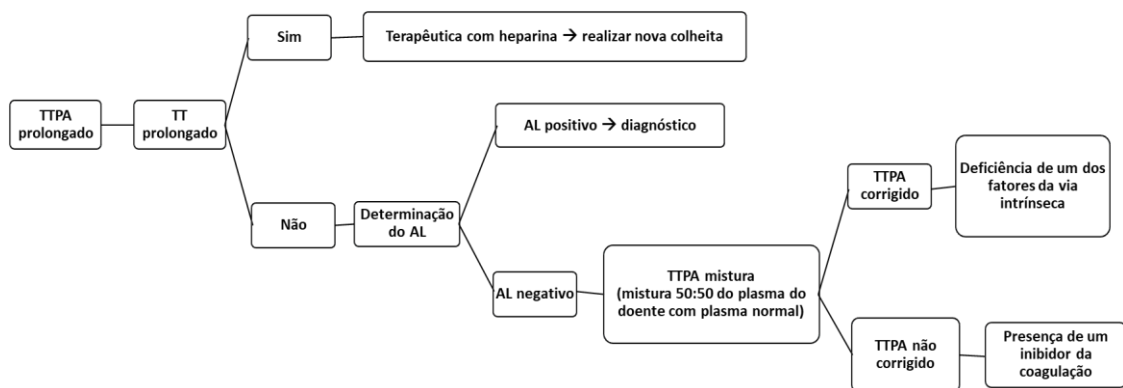


Figura 35. Esquema de avaliação de deficiências na coagulação quando o TTPA se encontra prolongado.

O **tempo de trombina (TT)** é utilizado para detetar fibrina, fibrinogénio ou os produtos da sua degradação, detetar anomalias do fibrinogénio e o aumento da fibrinólise, avaliar a coagulação intravascular disseminada e monitorizar a terapêutica com heparina. Este teste utiliza trombina bovina purificada, que ao interagir com o fibrinogénio existente na amostra forma um coágulo. O tempo necessário para a formação do coágulo é definido como TT⁴⁸.

A dosagem específica dos fatores da coagulação é baseada, na sua maioria, no TTPA ou no TP, em que é utilizado um plasma deficiente num único fator, o fator a determinar, encontrando-se os restantes fatores em concentrações normais. O fator XIII é determinado pelo imunoensaio com antígeno dirigido ao fator XIII (Tabela 14)⁴⁸.

Tabela 14. Métodos de determinação específicos dos fatores da coagulação.

Fator	Método de determinação
Fator II, Fator V, Fator VII, Fator X (via extrínseca)	Avaliado pelo TP
Fator VIII, Fator IX, Fator XI, Fator XII (via intrínseca)	Avaliado pelo TTPA
Fator XIII	Este fator é essencial para estabilização da fibrina e para proteção da degradação desta pelo sistema fibrinolítico. Avaliado pelo teste do antigénio contra o fator XIII, que utiliza partículas de látex associadas a Ac monoclonais dirigidos para a subunidade A do fator, permitindo a sua determinação. A deficiência deste fator pode ser indicativa de doença inflamatória intestinal e leucemia aguda. O aumento da atividade deste fator pode indicar leucemia crónica com aumento da atividade megacariocítica.

2.4.3.3. Fibrinólise

O teste de fibrinólise consiste na deteção dos produtos de degradação de fibrinogénio e da fibrina, como os D-dímeros, referentes à fase final da cascata da coagulação. A determinação da concentração de ambos os analitos (fibrinogénio e D-dímeros) é realizada em amostras de plasma. Elevados níveis de fibrinogénio estão associados ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. Os D-dímeros são compostos solúveis que resultam da degradação da fibrina; elevados níveis no plasma estão associados a tromboembolismo venoso, tromboembolismo venoso profundo e embolismo pulmonar⁴⁸.

2.4.3.4. Estudo molecular

O estudo genético da trombofilia é realizado no equipamento GeneXpert[®] e consiste num teste de genotipagem qualitativo dos fatores II e V (via comum da coagulação). Este teste pode ser realizado em sangue total com citrato de sódio ou EDTA (Figura 36a). As mutações do fator II (protrombina) e do fator V estão associados ao aumento do risco de trombose venosa. A mutação no fator II está associada a níveis plasmáticos de protrombina elevados. A mutação no fator V causa resistência à clivagem pela Proteína C ativada (PC)⁵⁸.

Este sistema é automatizado e utiliza cartuchos descartáveis que contêm os reagentes necessários à reação de PCR em tempo real (Figura 36b). Os cartuchos incluem os reagentes para deteção dos alelos normais e mutados dos fatores II e V, um controlo para verificar a integridade da sonda, que verifica a reidratação dos reagentes, o volume do tubo de PCR e a estabilidade do corante. Todos estes componentes permitem a determinação do genótipo de ambos os fatores, através de fluorescência⁵⁹ (como já foi explicado no subcapítulo 2.3.4.).

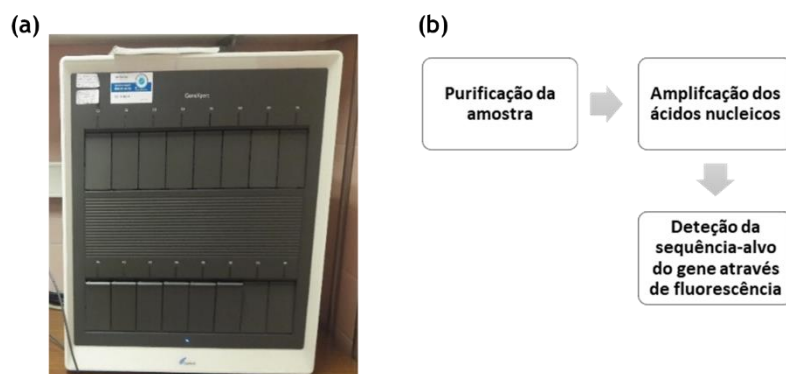


Figura 36. (a) Equipamento GeneXpert®; (b) Esquema da reação de PCR em tempo real.

2.4.3.5. Fator de von Willebrand

O Fator de von Willebrand é sintetizado pelas células endoteliais e pelos megacariócitos. Este fator é uma proteína com duas funções: promove a adesão plaquetar ao subendotélio vascular quando ocorre lesão vascular e é a molécula transportadora do fator VIII, protegendo-o de destruição prematura. A doença de von Willebrand caracteriza-se pela diminuição do nível plasmático do FvW ou pela perda de função do mesmo, podendo também verificar-se diminuição do fator VIII. Esta doença divide-se em três categorias: o tipo 1 caracteriza-se pela deficiência quantitativa parcial do fator; no tipo 2 verifica-se anormalidade funcional do fator; no tipo 3 ocorre uma deficiência completa do fator⁴⁸.

O Fator de von Willebrand é avaliado por dois testes: teste do antigénio do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) e teste da atividade do cofator ristocetina do FvW (R:CoF). Ambos são ensaios imunoturbidimétricos que utilizam partículas de látex (Tabela 13). O teste FvW:Ag determina quantitativamente a concentração plasmática do fator. O teste R:CoF determina quantitativamente a atividade plasmática do FvW, reproduzindo a capacidade do fator interagir com um dos recetores das plaquetas. A ristocetina é um antibiótico com capacidade de aglutinar as plaquetas na presença do FvW. A avaliação do rácio entre os dois testes permite concluir o diagnóstico⁶⁰.

2.4.3.6. Anticoagulante lúpico

O anticoagulante lúpico (AL) é um anticorpo com afinidade para fosfolípidos carregados negativamente (Ac antifosfolipídico) ou para complexos entre fosfolípidos e proteínas, como no caso dos fatores de coagulação e da protrombina. Este anticorpo foi inicialmente encontrado em pacientes com lúpus eritematoso sistémico e é um inibidor da cascata da coagulação associado a trombozes. Devido ao AL ter afinidade para a protrombina, quando estas moléculas estão ligadas, a protrombina não se encontra disponível para formar a trombina para posteriormente degradar a fibrina e, conseqüentemente, o coágulo não é destruído. O AL também tem a capacidade de se ligar à β_2 -glicoproteína I; esta molécula está presente na membrana plaquetar e é essencial para o processo de adesão das plaquetas através da ligação destas ao recetor do colagénio⁴⁸.

São realizados dois testes para a detecção do AL: o teste de sílica (*Silica Clotting Time*) e o teste com veneno de víbora Russel diluído. Ambas as técnicas utilizam baixas concentrações de fosfolípidos e é determinado o tempo de coagulação da amostra; no caso de o AL estar presente, o tempo de coagulação é prolongado. Esta determinação baseia-se na avaliação do TTPA⁶⁰.

2.4.3.7. Inibidores da coagulação

A proteína C, a proteína S livre e a antitrombina são inibidores da cascata da coagulação. A proteína C é uma proteína dependente de vitamina K, ativada na presença de trombina e pode ser determinada no plasma⁴⁸. A determinação da proteína C consiste na incubação da proteína com o seu ativador e é quantificada pela determinação do complexo cromogénico sintético, ao comprimento de onda de 405 nm⁶⁰.

A proteína S livre é uma glicoproteína dependente de vitamina K, que pode ser encontrada no plasma na sua forma livre ou ligada à proteína transportadora da fração C4b do complemento. A proteína S é o cofator da proteína C e aumenta o seu efeito anticoagulante⁴⁸. A proteína S é determinada por ensaio imunoturbidimétrico que utiliza partículas de látex associadas a anticorpos monoclonais contra a proteína S humana⁶⁰. Défices de proteína S livre representam uma maior predisposição para tromboembolismo venoso⁴⁸.

A antitrombina é o principal inibidor fisiológico da coagulação, uma vez que inibe as proteases da coagulação, especificamente a trombina, o fator Xa e o fator IXa. A antitrombina é essencial para o sucesso da terapia anticoagulante com heparina⁴⁸. O teste baseia-se na determinação de um substrato cromogénico sintético a $\lambda = 405 \text{ nm}$, e na desativação do fator Xa⁶⁰. A diminuição da concentração da antitrombina está associada a maior risco de doenças trombóticas⁴⁸.

2.4.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica com capacidade de realizar uma análise multiparamétrica na mesma base celular e a sua aplicação tem demonstrado elevada importância no diagnóstico e monitorização de neoplasias hematopoiéticas e na fenotipagem (imunofenotipagem) de células. A citometria de fluxo permite identificar subpopulações de células anormais, atribuir uma linhagem e determinar o estado de maturação da célula. Estas características celulares são determinadas pela deteção de moléculas expressas na membrana celular³⁰.

A citometria de fluxo tem como princípio base o estudo das células ou de partículas biológicas suspensas num fluxo fluido, mimetizando o fluxo sanguíneo. O citómetro possui na sua constituição um laser, que ao detetar a passagem da partícula permite analisar o seu tamanho e complexidade (granularidade). É possível identificar as moléculas expressas na superfície celular pela utilização de anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, que têm afinidade para a molécula específica a estudar. Os fluorocromos ao serem atravessados

pelo laser ficam no estado excitado e emitem luz que é detetada pelo detetor, traduzindo-se num sinal de fluorescência³⁰.

No equipamento disponível neste hospital é possível utilizar até quatro fluorocromos no mesmo tubo e apesar de os quatro absorverem luz no mesmo comprimento de onda, o comprimento de onda da fluorescência emitida é diferente; esta característica permite distinguir os vários fluorocromos utilizados. Esta técnica pode ser aplicada em amostras de sangue total com EDTA, aspirados medulares (medulograma) e lavados broncoalveolares. A citometria é frequentemente aplicada em estudos de populações linfocitárias em pacientes com VIH e na classificação de leucemias e linfomas.

2.5. Microbiologia

Durante o desenvolvimento do ser humano ocorre a formação de uma comunidade de organismos (microbiota ou flora normal) na superfície da pele, na cavidade oral e na cavidade nasal, nos intestinos, no trato genital e urinário⁵⁰. Nesta secção o estudo das amostras biológicas incide sobre como uma alteração na microbiota pode resultar numa doença.

As bactérias podem ser agrupadas consoante a sua morfologia, a estrutura da sua parede celular e as suas diferentes categorias nutricionais. Morfologicamente as bactérias podem classificar-se em cocos (células de forma esférica), bacilos (células em forma de bastonete) e espirilos (células em forma espiral). Os cocos e bacilos podem apresentar-se como célula única ou como aglomerados de variadas formas (Figura 37)⁵⁰.

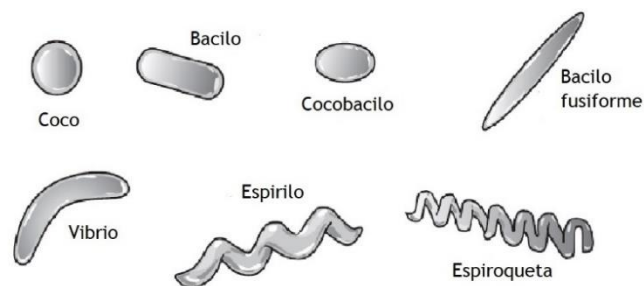


Figura 37. Classificação morfológica das bactérias (adaptado de Murray P.R. et al., 2016)⁵⁰.

Todas as bactérias apresentam na sua constituição citoplasma e membrana plasmática. A parede celular é também uma característica comum a todas as bactérias, com exceção dos micoplasmas; esta estrutura protege as células bacterianas de sofrer lise osmótica, confere forma celular e evita o contacto da bactéria com substâncias externas tóxicas. A parede celular bacteriana é constituída por várias camadas de peptidoglicano formando uma estrutura rígida. O peptidoglicano é um polímero essencial para garantir a estrutura da bactéria, para a sua replicação e sobrevivência em ambientes geralmente hostis. Deste modo, tendo em consideração a estrutura, os componentes e as funções da parede celular podemos classificar as bactérias em dois tipos: bactérias Gram-positivo e bactérias Gram-negativo (Figura 38). As bactérias Gram-positivo caracterizam-se por uma parede celular espessa composta por peptidoglicano e outros componentes como ácidos lipoteicóicos,

ácidos teicóicos, complexos polissacarídeos e proteínas. As bactérias Gram-negativo apresentam uma camada de peptidoglicano menos espessa que as bactérias Gram-positivo; contudo, as bactérias Gram-negativo apresentam uma membrana externa rica em proteínas como recetores, transportadores e porinas, que permitem a difusão de moléculas hidrofílicas. A membrana externa mantém a estrutura bacteriana, apresenta-se como uma barreira permeável a grandes moléculas como a lisozima e moléculas hidrofóbicas e protege a célula bacteriana quando esta se encontra em situações ambientais adversas. Entre a face externa da membrana citoplasmática e a membrana externa encontra-se o espaço periplasmático que contém várias enzimas hidrolíticas, importantes no metabolismo da bactéria, e proteínas com funções vitais⁵⁰.

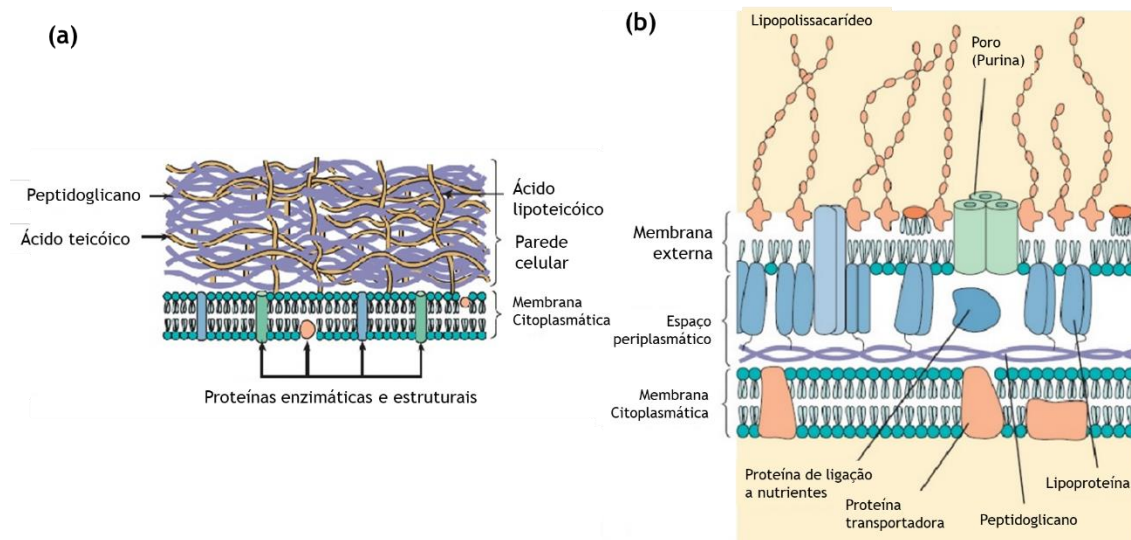


Figura 38. Constituição da parede celular bacteriana. (a) Parede celular de bactérias Gram-positivo; (b) Parede celular de bactérias Gram-negativo (adaptado de Murray P.R. et al., 2016)⁵⁰.

O crescimento bacteriano requer uma fonte de energia e elementos necessários para a produção de compostos orgânicos (catabolismo) para sintetizar os seus componentes (anabolismo). As bactérias podem ser classificadas em heterotróficas, quando o seu metabolismo se baseia na oxidação de compostos orgânicos (hidratos de carbono, lípidos e proteínas), e autotróficas quando o seu metabolismo se baseia na oxidação de compostos inorgânicos (CO_2). Os microrganismos heterotróficos podem ainda ser classificados em **aeróbios**, **anaeróbios** e **fermentadores**. A respiração aeróbia baseia-se na oxidação completa da glucose e utiliza o oxigénio como aceitador final de eletrões; esta oxidação culmina na produção de moléculas de ATP. Na respiração anaeróbia o aceitador final de eletrões pode ser substâncias como NO_3^- , SO_4^{2-} ou CO_2 ; é menos eficiente pois existe menor produção de moléculas de ATP, quando comparada com a respiração aeróbia. Este processo pode ser utilizado por microrganismos anaeróbios estritos ou anaeróbios facultativos. Outro processo de obtenção de energia é a fermentação. O processo de fermentação mais frequente é a fermentação láctica; este processo é efetuado por bactérias lácticas que suportam ambientes com valores de pH baixos. As bactérias lácticas não possuem a enzima catalase, mas possuem peroxidases ou a enzima superóxido dismutase. Podem ocorrer outras fermentações não

láticas que têm como produto final o etanol (fermentação alcoólica), acetato ou acetona (fermentação butírica). Os microrganismos podem ainda ser classificados em relação à sua fonte de carbono, oxigénio (Tabela 15) e azoto⁵⁰.

Tabela 15. Classificação das bactérias tendo em conta a fonte de carbono e de oxigénio.

Fonte de Carbono	Quimioautotróficos	Utilizam o CO ₂ como única fonte de carbono.
	Quimoheterotróficos	Utilizam compostos orgânicos reduzidos e pré-formados de outros organismos.
Fonte de oxigénio	Aeróbios obrigatórios	São dependentes do oxigénio, só crescem na sua presença.
	Anaeróbios obrigatórios	O oxigénio é tóxico para estas bactérias.
	Anaeróbios facultativos	Podem utilizar ou não o oxigénio; Conseguem crescer na presença ou na ausência de oxigénio, contudo o crescimento é mais produtivo na sua presença.
	Anaeróbias - aerotolerantes	Estas bactérias são anaeróbias, contudo o oxigénio não é tóxico, apenas não é utilizado.
	Microaerófilos	Estas bactérias sofrem os efeitos tóxicos do nível normal do oxigénio atmosférico (20%) e preferem níveis de oxigénio na ordem dos 2-10% para crescerem.

Na secção de Microbiologia encontram-se disponíveis os seguintes equipamentos para estudo dos diversos microrganismos: estufas de incubação a diferentes temperaturas (30 ± 2 °C; 35 ± 2 °C; 41 ± 2 °C), uma centrífuga, um dispositivo de coloração automática para coloração de Gram, microscópicos óticos, VITEK® e uma câmara de fluxo laminar. As amostras biológicas podem apresentar-se de quatro modos: frasco asséptico, zaragatoa, portagerme e garrafa de hemocultura.

A estrutura deste subcapítulo está de acordo com a execução do trabalho diário na secção de Microbiologia do LPC do CHUCB. As amostras entregues no laboratório são processadas consoante o tipo de produto biológico, seguidamente são observados os resultados (análise microscópica das amostras, observação do crescimento microbiano em meio sólido ou em meio líquido), são realizados testes intermédios de identificação microbiana, e é efetuada a identificação definitiva e determinação do antibiograma, que permite definir a estratégia terapêutica a indicar ao clínico (Figura 39).

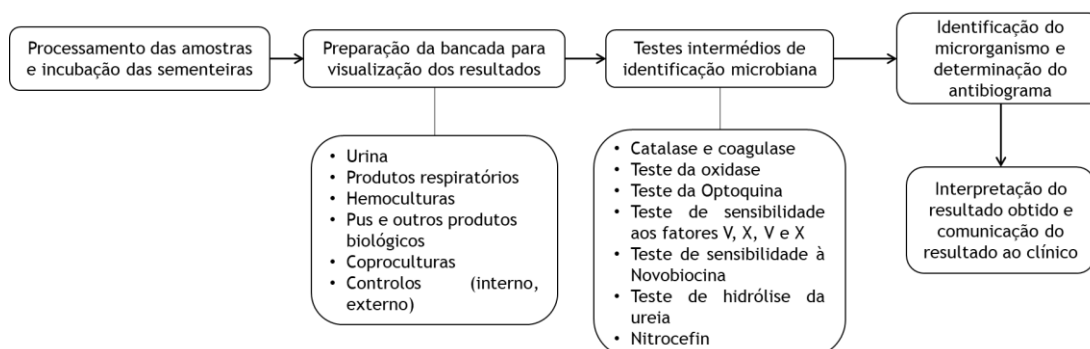


Figura 39. Fluxograma do funcionamento da secção de Microbiologia.

2.5.1. Meios de cultura

Os meios de culturas são preparações, líquidas ou sólidas, constituídas por nutrientes e outras substâncias (como antibióticos) que fornecem as condições ideais para o crescimento

de microrganismos³⁰. Os meios de cultura podem ainda ser classificados em **seletivos**, constituídos por componentes que apenas permitem o crescimento de bactérias com características específicas, e **não-seletivos**^{30,50}.

Nos meios líquidos a identificação de crescimento microbiano é realizada pela observação de turvação do meio, sendo que a presença de turvação é indicativa que há crescimento microbiano. Os meios líquidos disponíveis no laboratório são: caldo de carne, meio Todd-Hewitt e meio líquido Mueller Hinton (meio não seletivo utilizado no estudo de suscetibilidade a antibióticos). A identificação dos microrganismos que crescem em meios de cultura líquidos é realizada em meios de cultura sólidos. Nos meios sólidos o crescimento microbiano é observado pelo crescimento de massa microbiana (aglomerados de colônias em que não é possível visualizar colônias isoladas), de colônias ligeiramente aglomeradas e de colônias isoladas. Neste tipo de meios é possível identificar o aspeto macroscópico das colônias (aspeto mucoide, forma, tipo de hemólise). Os meios sólidos utilizados frequentemente no laboratório encontram-se resumidos na Tabela 16.

Tabela 16. Meios de cultura sólidos⁶¹.

Meio de cultura	Aplicação
Gelose sangue (GS)	<ul style="list-style-type: none"> - contém sangue de carneiro que permite a deteção de hemólise - meio nutritivo que permite o crescimento da maioria das bactérias independentemente do seu metabolismo - permite isolar microrganismos aeróbios e anaeróbios - incuba à temperatura de 35 °C, pode incubar em atmosfera de aerobiose, em CO₂ ou em anaerobiose
Gelose Mac Conkey (MCK)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para bactérias Gram-negativo (contém cristal de violeta e sais biliares) - o cristal de violeta permite identificar as bactérias que realizam a fermentação de lactose pela viragem do indicador de pH vermelho neutro - os sais biliares formam um precipitado nas bactérias fermentadoras de lactose - incuba em atmosfera normal, à temperatura de 35 °C durante 24 h
Gelose Chocolate PoliVitex (PVX)	<ul style="list-style-type: none"> - contém sangue aquecido que fornece o fator X (hemina) e o fator V (NAD) - utilizado para identificar microrganismos exigentes como <i>Neisseria</i>, <i>Haemophilus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> - incuba em atmosfera de CO₂, à temperatura de 35 °C durante 24 h
Gelose Chocolate <i>Haemophilus</i> (HAE2)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para várias espécies de <i>Haemophilus</i> - contém sangue aquecido que fornece o fator X (hemina) e o fator V (NAD) - meio associado a antibióticos e antifúngicos, permitindo inibir o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivo e de leveduras - incuba em atmosfera de CO₂, à temperatura de 35 °C durante 24 h
Gelose de chocolate VCAT3 (vancomicina, colistina, anfotericina, trimetropim)	<ul style="list-style-type: none"> - contém sangue aquecido que fornece o fator X (hemina) e o fator V (NAD) - tem na sua composição os antibióticos vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim que permitem inibir a maioria das bactérias e de leveduras - quando incubado em atmosfera de CO₂ à temperatura de 25 °C permite o isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e de <i>Neisseria meningitidis</i> - incuba em atmosfera de CO₂, à temperatura de 35 °C durante 24 h
Gelose Granada (GRAN)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para o rastreamento do microrganismo <i>Streptococcus agalactiae</i>, em grávidas e recém-nascidos - contém metotrexato, soro de cavalo e amido que produzem um pigmento laranja na presença de colônias de estreptococos do grupo B-hemolíticos - incuba em atmosfera de anaerobiose, à temperatura de 35 °C durante 24 h

Tabela 16. Meios de cultura sólidos (continuação)⁶¹.

Gelose CNA (ácido nalidíxico e colistina)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para isolar bactérias Gram-positivo - contém sangue de carneiro que permite a detecção de hemólise - contém os antibióticos ácido nalidíxico e colistina que inibem a maioria das bactérias Gram-negativo e <i>Bacillus</i> - incuba em atmosfera normal, à temperatura de 35 °C durante 24 h
Gelose Sabouraud Gentamicina Clorofenicol 2 (SGC2)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para leveduras e fungos - contém peptona, dextrose e pH ácido; condições que favorecem o crescimento fúngico em relação ao bacteriano - contém os antibióticos gentamicina e cloranfenicol; a gentamicina inibe o crescimento da maioria das bactérias (Gram-positivo e Gram-negativo) e o cloranfenicol melhora a seletividade de espécies resistentes à gentamicina - incuba em atmosfera normal, à temperatura de 30 °C durante 24 h
Gelose cromogénica ID Candida (CAN2)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para isolar leveduras - contém dois substratos cromogénicos, que quando hidrolisados, permitem identificação de colónias <i>Candida</i>; o substrato hexosaminidase identifica a <i>Candida albicans</i> (apresenta coloração verde); o segundo substrato apresenta uma cloração rosa que identifica uma cultura mista (<i>C. tropicalis</i>, <i>C. lusitanae</i> e <i>C. kefyr</i>) - incuba em atmosfera normal, à temperatura de 30 °C durante 24 h
Gelose Yersinia (YER)	<ul style="list-style-type: none"> - meio de isolamento seletivo de <i>Yersinia</i> - contém manitol salgado e vermelho neutro; a <i>Yersinia</i> fermenta o manitol, juntamente com o indicador de pH vermelho neutro, apresenta uma coloração cor de rosa escuro a vermelho - contém cristal violeta e mistura de vários antibióticos que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivo e da maioria das bactérias Gram-negativo - incuba em atmosfera normal, à temperatura de 30 °C durante 48 h
Gelose SS (<i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> (contém lactose e tiosulfato de sódio) - colónias fermentam lactose (coloração rosa ou incolor) e reduzem o tiosulfato (coloração incolor com centro negro) - contém sais biliares e corantes que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivo - incuba em atmosfera normal, à temperatura de 35 °C durante 24/48 h
Gelose de Campyloset (CAM)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para isolamento de <i>Campylobacter</i> intestinal (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> principalmente) a partir de amostras de fezes - a presença de sangue de carneiro e de agentes redutores favorece o crescimento do microrganismo - colónias de <i>Campylobacter</i> apresentam coloração acinzentada e um tamanho pequeno - contém agentes antibióticos e antifúngicos que inibem o crescimento de contaminantes bacterianos e fúngicos - meio incuba em atmosfera de microaerofilia, à temperatura de 42 °C durante 48 h
Gelose MRSM	<ul style="list-style-type: none"> - meio cromogénico para rastreio de colónias <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metacilina (MRSA) - colónias detetadas pela revelação da atividade enzimática, apresentando uma coloração rosa ou vermelha - meio seletivo com associação de antibióticos que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo que não pertencem ao género <i>Staphylococcus</i>, de leveduras e bolores - incuba em atmosfera normal, à temperatura de 35 °C durante 24 h
Manitol Salgado (MSA2)	<ul style="list-style-type: none"> - meio seletivo para isolar <i>Staphylococcus spp</i> e para identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i> - contém manitol; a fermentação do manitol origina colónias amarelas (exemplo do <i>S. aureus</i>) - meio com elevado teor em cloreto de sódio, limitando o crescimento de outras bactérias que não pertencem ao género <i>Staphylococcus</i> - incuba em atmosfera normal à temperatura de 35 °C, durante 24 h
Mueller Hinton (MHE)	<ul style="list-style-type: none"> - meio não seletivo utilizado sobretudo no estudo da suscetibilidade aos antimicrobianos
Mueller Hinton com sangue (MHF)	<ul style="list-style-type: none"> - meio enriquecido com sangue de cavalo - utilizado para o estudo do antibiograma de microrganismos exigentes (ex: <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Campylobacter jejuni</i>)

Outros meios existentes no laboratório são: o meio *Pylori*, um meio seletivo para isolar *Helicobacter pylori* a partir de amostras gástricas, uma vez que esta bactéria é responsável por gastrites e está associada ao desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais; meio SMAC (meio Mac Conkey com Sorbitol), utilizado para identificar a bactéria *E. coli* enterohemorrágica; meio Brilhance, utilizado para pesquisa de estirpes de bactérias resistentes aos carbapenemos, e meio Lowenstein-Jensen, utilizado para pesquisa e isolamento de micobactérias⁶¹.

Uma cultura microbiana mista define-se por uma cultura em que seja possível observar diferentes tipos de microrganismos. Uma cultura pura é definida por uma cultura em que todas as colónias obtidas pertencem ao mesmo microrganismo. Um dos principais objetivos neste laboratório é, numa cultura microbiana em meio sólido, obter colónias isoladas para poder identificar os vários tipos de microrganismos que possam estar presentes na amostra e estudar os mesmos a partir de uma cultura pura.

2.5.1.1. Técnicas de sementeira

Existem diversas técnicas de sementeira em meio sólido como sementeira para contagem de colónias, sementeira por quadrantes, por espalhamento, sementeira em profundidade, sementeira em rede e sementeira por meio de incorporação. As técnicas mais frequentes no laboratório de Microbiologia do CHUCB são a técnica de sementeira por quadrantes (Figura 41) e a técnica de sementeira para contagem de colónias (Figura 40). As técnicas de sementeira devem ser realizadas com material estéril e num ambiente de assepsia. O ambiente de assepsia mais frequentemente utilizado obtém-se à chama do bico de Bunsen; porém, estas técnicas também podem ser realizadas na câmara de fluxo laminar.

Na técnica de sementeira para contagem de colónias é utilizada uma ansa calibrada estéril e realiza-se uma estria central; seguidamente devem realizar-se estrias paralelas a esta de forma a inocular toda a superfície da placa. Esta técnica permite avaliar de forma quantitativa a amostra, uma vez que o volume inoculado é conhecido, é possível realizar uma estimativa do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por mililitro de volume inoculado (UFC/mL). Esta técnica é frequentemente utilizada nas amostras de urina, lavados bronco-alveolares e esperma.

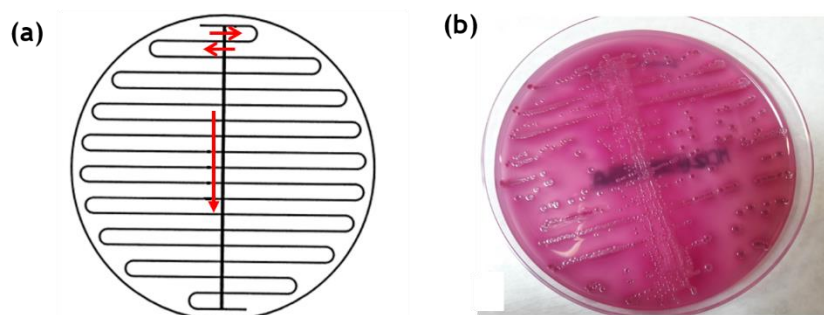


Figura 40. Técnica de sementeira para contagem de colónias. (a) Esquema de processamento (adaptado de McPherson R.A. et al., 2011)³⁰; (b) Placa inoculada pela técnica de sementeira para contagem de colónias.

Na técnica de sementeira por quadrantes ou técnica de esgotamento por meio de estrias superficiais, é utilizada uma ansa calibrada estéril, carregada com inóculo, e são realizadas estrias na superfície do agar. Esta técnica permite dividir o agar em quatro zonas (ou quadrantes) diminuindo a quantidade de inóculo; assim, o primeiro quadrante corresponde à zona onde a placa foi inoculada e como tal possui maior concentração de inóculo (colónias), já o último quadrante corresponde à zona com menor concentração de inóculo e com maior probabilidade de obter colónias isoladas. Esta técnica permite semi-quantificar a amostra, isto é, a amostra é avaliada por possuir muitas, algumas ou poucas colónias. Esta técnica de sementeira é praticamente utilizada nos restantes produtos biológicos que chegam ao laboratório, com a exceção dos já referidos na técnica descrita acima.

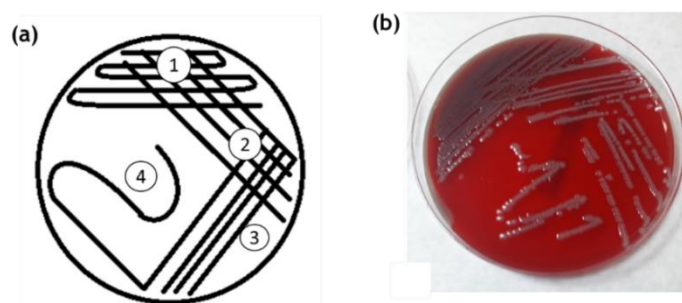


Figura 41. Técnica de sementeira por quadrantes. (a) Esquema de processamento; (b) Placa inoculada pela técnica de sementeira por quadrantes.

A técnica de sementeira em rede é essencialmente utilizada para realização de antibiogramas manuais (Figura 42). Nesta técnica é utilizada uma zaragatoa carregada de inóculo utilizada para realizar estrias sobre toda a superfície da placa em pelo menos quatro direções diferentes.

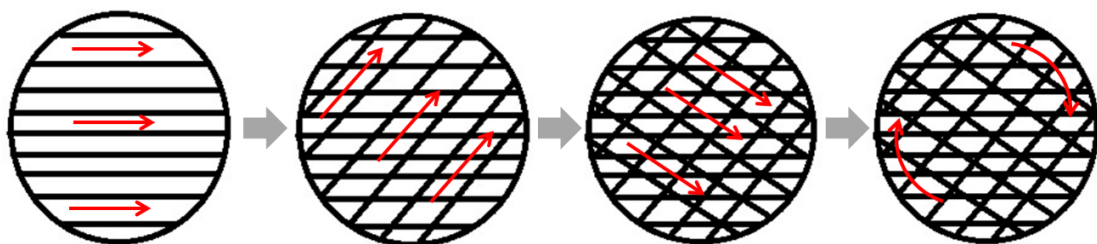


Figura 42. Esquema de processamento da técnica de sementeira em rede.

2.5.2. Urina

Para o diagnóstico de infeções do aparelho urinário é realizado o exame cultural (urocultura). As amostras de urina válidas para este exame são urinas colhidas assepticamente por recolha de jato médio da primeira da urina da manhã ou da urina após 2 horas sem urinar; urina colhida com saco coletor em crianças ou urina colhida por meio de algáliação. As amostras após a colheita devem ser enviadas de imediato ao laboratório, ou num período máximo de 2 horas e conservadas entre 2 - 8 °C.

As amostras de urina, colhidas de forma asséptica, são semeadas em gelose de sangue e meio MacConkey pela técnica de sementeira para contagem de colónias, com uma ansa de 1 µL à chama do bico de Bunsen. O sedimento e a avaliação bioquímica são realizados no equipamento de urianálise (subcapítulo 2.3.7.). Em caso de suspeita de colonização por leveduras (candidíase), a urina é semeada em meio *Candida*, pela técnica referida acima. A amostra de urina pode ainda ser semeada em meio CNA para isolamento seletivo de bactérias Gram-positivo, quando se observam colónias de bactérias do género *Proteus*.

Nas amostras de urina pode ser efetuada a pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila* utilizando um teste rápido imunocromatográfico (ImmuView®). Este teste permite a deteção qualitativa destes dois microrganismos. Este teste é um teste imunocromatográfico em formato “sandwich” (subcapítulo 2.3.8.), com um ponto controlo e dois pontos teste, um para o *S. pneumoniae* e outro para a *L. pneumophila*.

2.5.3. Aparelho Respiratório

As amostras de expetorações, secreções brônquicas, lavados e aspirados bronco-alveolares são parte integrante desta categoria dos produtos biológicos. As amostras são sempre processadas na câmara de fluxo laminar. A amostra é avaliada macroscopicamente, podendo ser classificada como purulenta, hemoptóica ou salivar; esta última é um critério de rejeição para a realização do exame cultural uma vez que a flora microbiana no trato respiratório seria valorizada, dificultando a identificação da bactéria patogénica e podendo levar a conclusões clínicas erradas³⁰.

Nas **expetorações e secreções brônquicas** são preparadas duas lâminas pelo método de estriamento, uma para coloração de Gram, para avaliação do número de células pavimentosas e polimorfonucleares e para observação dos microrganismos existentes, e outra para coloração de Ziehl-Neelsen para pesquisa de micobactérias. Considera-se que a amostra é produtiva para realizar o exame cultural quando o resultado da avaliação pela coloração de Gram apresentar uma contagem de células inferior a 5 células/campo e uma contagem de leucócitos superior a 20 leucócitos/campo. Quando as amostras são produtivas realiza-se o exame cultural através da técnica de sementeira por quadrantes nos meios GS (incuba em atmosfera de CO₂), MCK e HAE2 (incubam a atmosfera normal), à temperatura de 35 °C. Pode ainda ser realizado o exame micológico no qual a amostra é semeada em meio Sabouraud (atmosfera normal à temperatura de 30 °C).

As amostras de **lavados bronco-alveolares e de aspirados brônquicos** são sempre semeados e realizados dois esfregaços, para avaliação pela coloração de Ziehl-Neelsen e pela coloração de Gram. As amostras de lavados brônquio-alveolares são semeadas em meio PVX pela técnica de sementeira para contagem de colónias com uma ansa calibrada de 10µL. As amostras de aspirados brônquicos, quando o volume é suficiente, são centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos, posteriormente é desprezado o sobrenadante e processado o sedimento. Estas amostras são semeadas em GS (incuba em atmosfera de CO₂), MCK e HAE2 (incubam a atmosfera normal), pela técnica de sementeira por quadrantes e processam-se, de

igual modo, as lâminas como nas amostras de lavado bronco-alveolar. Nestas amostras é frequente realizar a pesquisa de micobactérias *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em tempo real no equipamento GenExpert® (Figura 26); neste teste de biologia molecular é também possível detetar mutações no gene que confere resistência ao antibiótico rifampicina (um dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose).

2.5.4. Hemoculturas

As colheitas de hemoculturas são indicadas em doentes com aumento de temperatura ou com temperatura inferior a 36 °C, com deterioração uni ou multiorgânica, ou em recém-nascidos quando existe suspeita de infeção.

Existem três tipos de garrafas de hemocultura: verde (crescimento aeróbio), laranja (crescimento anaeróbio) e amarelo (amostras pediátricas e destinado a crescimento aeróbio) (Figura 43a). Para as hemoculturas pediátricas é necessário cerca de 3 mL de sangue, enquanto no caso das hemoculturas em pacientes adultos (frascos verde e laranja) é necessário um volume de 10 mL de sangue. As garrafas de hemocultura são inoculadas à cabeceira do doente⁶¹.

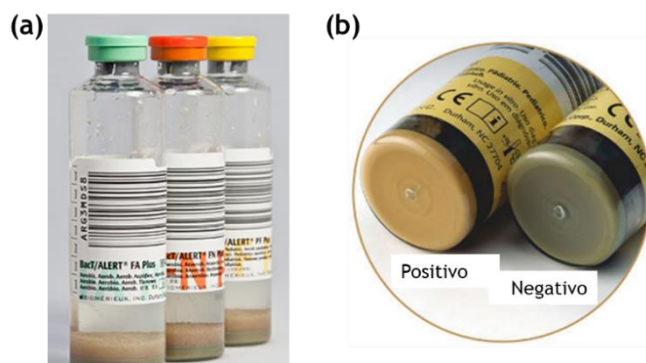


Figura 43. Garrafas de hemocultura (a) e interpretação do seu resultado (b)⁶¹.

Após a colheita, já no laboratório, as garrafas de hemocultura são colocadas no equipamento BacT/ALERT 3D para incubação a cerca de 37 °C durante um período de tempo que depende da suspeita do microrganismo presente na colheita. No fundo das garrafas de hemocultura encontram-se sensores de emulsão líquida que mudam a cor quando ocorre mudança do pH do meio devido ao crescimento microbiano. O crescimento microbiano produz CO₂ que altera o pH (Figura 43b). O tempo de incubação mais comum é de 5 dias; se após esse período a garrafa não positivar, o resultado é negativo indicando que não houve qualquer crescimento bacteriano na amostra. O tempo de incubação para fungos é de 14 dias, enquanto que para bactérias de difícil crescimento, como na suspeita de endocardite e de brucelose, o tempo de incubação é de 28 dias⁶¹.

No caso de uma garrafa de hemocultura positiva, inicia-se o estudo do microrganismo presente. Em todos os tipos de frascos é realizado imediatamente um esfregaço para coloração de Gram. As garrafas de hemocultura aeróbias e pediátricas são semeadas nos meios GS (incuba em atmosfera de CO₂) e MCK que incuba a atmosfera normal; ambos os meios incubam à temperatura de 35 °C. As garrafas de hemocultura anaeróbia são semeadas

nos meios GS (incuba em atmosfera de anaerobiose) e PVX (incuba em atmosfera de CO₂), ambos à temperatura de 35 °C. A técnica de sementeira utilizada é a sementeira por quadrantes.

2.5.5. Cateter vascular

As amostras de cateter vascular devem ser sempre acompanhadas de uma garrafa de hemocultura. O cateter é semeado em gelose sangue pela técnica de Maki, que consiste em inocular toda a superfície da placa através do rolamento do cateter pela mesma. Esta técnica deve ser realizada com uma ansa ou com uma pinça devidamente esterilizadas.

2.5.6. Fezes

As amostras de fezes são uteis para pesquisar e determinar o agente microbiano causador da diarreia ou da intoxicação alimentar³⁰. Nas amostras de fezes pode ser solicitado o exame cultural (coprocultura), a pesquisa de vírus, pesquisa de sangue oculto (subcapítulo 2.3.8.) e o exame parasitológico. O procedimento laboratorial destes exames é diferente e vai ser referido separadamente nos pontos seguintes.

2.5.6.1. Coprocultura

O exame cultural só deve ser realizado em amostras diarreicas, de diferentes dejeções (no máximo 3). As amostras de fezes moldadas não são processadas.

O exame cultural das amostras de fezes diarreicas deve ser realizado à chama pela técnica de sementeira por quadrantes nos seguintes meios: MCK, YER, SS, CAM. É indicado inocular o meio de tetrionato com a amostra de fezes; este meio é um meio de enriquecimento que favorece o crescimento das bactérias *Salmonella* e *Shigella*. Ao meio de tetrionato são adicionadas 2/3 gotas da solução de lugol para evidenciar estruturas bacterianas internas; o meio inoculado deve incubar à temperatura de 35 °C durante 6 horas e seguidamente inocular outro meio SS. Os meios MCK e SS incubam a atmosfera normal à temperatura de 35 °C, o meio YER incuba a atmosfera normal à temperatura de 30 °C, o meio CAM incuba em atmosfera de microaerofilia à temperatura de 42 °C. Quando o paciente tem idade inferior a 5 anos é inoculado também o meio de SMAC (*E. coli*), que incuba a atmosfera normal à temperatura de 35 °C.

2.5.6.2. Pesquisa de microrganismos nas fezes

Neste laboratório é possível pesquisar os seguintes microrganismos nas fezes: rotavírus e adenovírus, norovírus e a bactéria *Clostridium difficile*. Na pesquisa destes três microrganismos são realizados ensaios imunocromatográficos em formato “sandwich” (subcapítulo 2.3.8.). No caso de se verificar um resultado positivo para qualquer um dos vírus mencionados, o exame cultural não é realizado.

O rotavírus e o adenovírus são os agentes mais comuns de gastroenterites graves em bebés e crianças, podendo também ser encontrados em adultos. Estes vírus são transmitidos por contacto fecal-oral e os sintomas mais frequentes são diarreia e vômitos, dores de

cabeça, febre e dores abdominais. O rotavírus está associado ao tempo frio em clima temperado; o adenovírus não tem sazonalidade³⁰. Para rastrear estes vírus é utilizado o teste “CERTEST Rotavirus + Adenovirus” que utiliza duas membranas de nitrocelulose (A e B). No ponto teste da membrana A são detetados antigénios do vírus rotavírus; no ponto teste da membrana B são detetados antigénios do vírus adenovírus.

O norovírus causa gastroenterites agudas em todas as faixas etárias, sendo mais frequente em crianças com idade inferior a 5 anos, e distribui-se por vários ambientes. Este vírus está associado a altas taxas de infeção devido à sua estabilidade em alimentos e serviços ambientais³⁰. A presença de norovírus é pesquisado pelo teste “RIDAQUICK Norovirus”.

O *Clostridium difficile* é uma bactéria comensal do trato gastrointestinal, formadora de esporos e é uma bactéria anaeróbia estrita. O seu crescimento e consequente patologia está associada à exposição aos antibióticos, tratando-se de uma infeção endógena. Esta bactéria está associada a ambientes hospitalares e a sua deteção é realizada em amostras de fezes onde são detetadas as suas toxinas, A e B⁵⁰, e o seu antigénio, por teste imunocromatográfico.

2.5.6.3. Exame parasitológico

O exame parasitológico é realizado através da pesquisa dos parasitas *Cryptosporidium* e *Giardia* por teste imunocromatográfico; paralelamente, a amostra é processada para ser visualizada ao microscópio ótico para pesquisa de parasitas. Para o exame microscópico é retirada uma porção da amostra de fezes e é adicionada a uma solução tampão; seguidamente é centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante é descartado e o sedimento é utilizado para ser visualizado ao microscópio.

A criptosporidiose é uma doença diarreica causada pelo parasita do género *Cryptosporidium*, que desenvolve o seu ciclo de vida no intestino. Este parasita está protegido por uma “cápsula” exterior que lhe permite sobreviver fora do corpo do hospedeiro por longos períodos de tempo e tornando-o resistente a desinfetantes à base de cloro³⁰.

A giardiase é uma doença diarreica causada pelo parasita flagelado *Giardia*, que ocorre em todo o mundo, sendo mais prevalente em países em desenvolvimento, onde o acesso a água limpa e saneamento básico são condicionados³⁰. A pesquisa dos parasitas *Cryptosporidium* e *Giarda* é realizada por um teste imunocromatográfico em formato “sandwich” (subcapítulo 2.3.8.). Este teste possui dois pontos teste e um ponto de controlo; num dos pontos teste encontra-se imobilizado um anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium* enquanto no outro ponto teste se encontra imobilizado um anticorpo monoclonal anti-*Giardia*.

2.5.7. Líquidos biológicos

Nas amostras de **líquido pleural**, obtidas por toracocentese, e nas amostras de **líquido ascítico**, obtidas por paracentese, é realizado o exame microscópico (coloração de Gram e coloração de Ziehl-Neelsen) e o exame cultural. O exame cultural é realizado pela

técnica de sementeira por quadrantes. As amostras de líquido pleural são semeadas nos meios GS (incuba a atmosfera de CO₂), HAE2 e MCK (incubam ambos em atmosfera normal); todos os meios incubam à temperatura de 35 °C durante 24 horas. As amostras de líquido ascítico são semeadas nos meios GS (incuba em atmosfera de CO₂) e MCK (incuba a atmosfera normal), ambos à temperatura de 35 °C durante 24 horas. Os dois tipos de amostras devem também ser inoculadas numa garrafa de hemocultura pediátrica, cerca de 1 a 3 mL, e colocada no equipamento BacT/ALERT 3D; se o volume de amostra for insuficiente esta deve ser colocada em caldo de carne que favorece o crescimento microbiano.

Nas amostras de **líquido sinovial/ articular**, obtidas por punção articular, quando em quantidade suficiente, devem ser centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min com o objetivo de concentrar a amostra. O sobrenadante é rejeitado e é processado o sedimento para realizar o exame microscópico (coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen) e cultural. O exame cultural é realizado pela técnica de sementeira por quadrantes nos meios GS, VCAT (incubam em atmosfera de CO₂) e MCK (incuba a atmosfera normal), todos os meios incubam à temperatura de 35 °C. Deve ser inoculada uma garrafa de hemocultura pediátrica com cerca de 1 a 3 mL de amostra; quando o volume é insuficiente deve ser inoculado um caldo de carne.

2.5.8. Pus

As amostras de **pus** podem apresentar-se de duas formas: em meio Portagerme ou em zaragatoa. O meio Portagerme é um frasco que permite conservar a amostra estéril, ideal para a estudar em anaerobiose. O Portagerme contém um gel que permite verificar se durante a colheita houve contaminação da amostra com oxigénio; o gel tem cor transparente e cora de azul quando entra em contacto com oxigénio⁶¹. Na amostra de pus é realizado o exame microscópico, para avaliação da amostra por coloração de Gram, e o exame cultural, que depende de como foi obtida a amostra.

- Nas amostras de pus enviadas em **Portagerme** é necessário verificar se o meio não entrou em contacto com o oxigénio pois esse contacto pode comprometer a integridade da amostra se existe suspeita de infeção por bactérias anaeróbias. O exame cultural é realizado em dois meios de GS (um incuba em atmosfera de CO₂ e o outro em anaerobiose), meio MCK e caldo de carne, que incubam em atmosfera normal; todos os meios incubam à temperatura de 35 °C.
- Nas amostras de pus enviadas em **zaragatoa**, é necessário que sejam enviadas duas zaragatoas. Uma das zaragatoas é utilizada para o exame microscópico por coloração de Gram. A outra zaragatoa é utilizada para realizar o exame cultural nos meios GS, que incuba em atmosfera de CO₂, e MCK que incuba em atmosfera normal. A zaragatoa utilizada para realizar o exame cultural é posteriormente colocada em caldo de carne. Todos os meios incubam à temperatura de 35 °C. No caso de ser enviada apenas uma zaragatoa, esta é colocada em caldo de carne e, posteriormente é realizado o exame cultural.

Independentemente da forma de apresentação da amostra de pus, o exame cultural pode ainda ser realizado em meio *Candida* quando se trata de uma ferida operatória ou abscesso intra-abdominal; este meio incuba a 30 °C em atmosfera normal durante 24 horas.

2.5.9. Líquido cefalorraquidiano

Nas amostras de **líquido cefalorraquidiano (LCR)**, colhidas por punção lombar, são realizados os exames citológico, microscópico e cultural. São retirados cerca de 20 mL de amostra, distribuídos por três tubos estéreis. O tubo 1 é utilizado em estudos bioquímicos e imunológicos; o tubo 2 é utilizado para estudo microbiológico; o tubo 3 é utilizado para contagem celular e diferencial³⁰. Este tipo de amostra é frequentemente utilizado para confirmar o diagnóstico de meningite bacteriana. As amostras de LCR devem ser processadas imediatamente a seguir à sua colheita, pois alguns dos microrganismos que possam eventualmente estar presentes são lábeis, exemplos destes microrganismos são *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*⁵⁰.

O exame citológico é realizado na câmara de contagem de Nageotte por um médico patologista. Neste exame a amostra de LCR é avaliada por contagem celular. São preparadas duas lâminas para corar pela coloração de Gram e pela coloração de Ziehl-Neelsen.

Para realizar o exame cultural, a amostra de LCR deve ser centrifugada a 2000 rpm durante 10 min, quando existe quantidade suficiente; o sobrenadante é desprezado e processa-se o sedimento. A sementeira por quadrantes é realizada nos meios GS, PVX, Sabouraud e MCK. É inoculada uma garrafa de hemocultura pediátrica ou um caldo de carne, quando o volume de amostra é inferior a 1 mL. A amostra deve ser guardada a 35 °C na estufa.

É realizado um teste de biologia molecular, PCR *multiplex* em tempo real (subcapítulo 2.3.6.), para pesquisa de bactérias, vírus e fungos na amostra, nomeadamente a bactéria *Neisseria meningitidis*.

2.5.10. Biópsia

As **biópsias** devem ser reduzidas em pequenos pedaços. O exame microscópico é realizado através da coloração de Gram. A sementeira por quadrantes é realizada no meio GS, que incuba em atmosfera de CO₂, e MCK que incuba em atmosfera normal; é inoculado um caldo de carne com uma porção da amostra. Os meios incubam à temperatura de 35 °C durante 24 horas.

No caso de a amostra ser sólida ou não ser possível reduzir a mesma, esta deve ser colocada em caldo de carne e após 24 horas este meio deve ser utilizado para inocular os meios anteriormente indicados.

2.5.11. Espermiocultura

Nas **espermioculturas** e **exsudados vaginais** é realizada a pesquisa da bactéria *Chlamydia trachomatis* e dos micoplasmas *Mycoplasma hominis* e *Ureoplasma urealyticum*.

A bactéria *Chlamydia trachomatis* é a bactéria mais frequentemente referida como a causadora de doenças sexualmente transmissíveis. Todas as estirpes desta bactéria utilizam o ser humano como seu único hospedeiro natural. A doença é mais frequentemente identificada no género masculino e é mais comum em pessoas de baixo nível socioeconómico, em homens que têm relações sexuais com outros homens e em pessoas que visitaram países endémicos para o linfogranuloma venéreo. Esta bactéria tem uma parede celular semelhante à parede celular das bactérias Gram-negativo, contudo não possui peptidoglicano³⁰.

Os micoplasmas são os organismos de menor tamanho, são pleomórficos e, na sua maioria, são anaeróbios facultativos que se replicam por fissão binária. Os micoplasmas distinguem-se das restantes bactérias por não possuírem parede celular. As espécies de micoplasmas genitais estudados neste laboratório pertencem aos géneros *Ureaplasma* e *Mycoplasma*. Estas bactérias podem ser encontradas na mulher, como bactérias colonizadoras da vagina e do colo do útero, e em menor frequência no homem. A colonização de crianças com micoplasmas genitais pode ocorrer durante o parto, através da placenta ou através de infeções ascendentes. O aumento da colonização por micoplasmas após a puberdade está associado com a atividade sexual. O micoplasma *Ureaplasma* spp. pode causar cálculos urinários e uretrite não gonocócica. Por outro lado, o micoplasma *Mycoplasma hominis* tem sido relacionado com doença inflamatória pélvica, com pielonefrite e pode estar associado à vaginose bacteriana. Estas duas estirpes podem ser estudadas a partir de esfregaços uretrais, vaginais ou endocervicais, sangue, urina, material de abcesso, secreções prostáticas, sémen ou tecidos³⁰.

Nas amostras de esperma são realizados o exame citológico e cultural (**espermocultura**). No exame citológico a amostra é colocada entre lâmina e lamela e observada ao microscópio com a objetiva de 40x, com o objetivo de pesquisar *Trichomonas* e avaliar o número de células epiteliais e polimorfonucleares. É preparado também um esfregaço para a coloração de Gram. O exame cultural é realizado por sementeira para contagem de colónias nos meios de GS, VCAT, MCK e *Candida*. É efetuada a pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureoplasma urealyticum*; esta pesquisa é efetuada numa galeria que permite a identificação e contagem de colónias destas estirpes, e a realização de testes de sensibilidade de cada estirpe aos 9 antibióticos presentes no suporte (Figura 44).

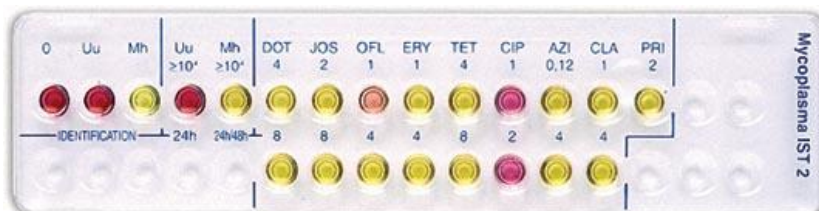


Figura 44. Galeria para deteção de *Mycoplasma* e *Ureoplasma* (Biomérieux®)⁶¹. DOT: doxicilina; JOS: josamicina; OFL: ofloxacina; ERY: eritromicina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; AZI: axitromicina; CLA: claritromicina; PRI: pristinamicina.

2.5.12. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* metacilina-resistente

Nos últimos anos tem sido frequente a identificação de infecções causadas pelo microrganismo *Staphylococcus aureus* resistentes a metacilina (MRSA). Esta estirpe é caracterizada pela presença de uma toxina, a toxina leucocidina de Panton-Valentine (PVL). Esta toxina tem sido referida como a toxina responsável pela necrotização da pele e por infecções em tecidos moles, que pode ocasionalmente causar pneumonias fatais. O mecanismo de resistência desta estirpe à metacilina (oxacilina) deve-se à presença do gene *mecA*, gene responsável pela produção de uma nova proteína de ligação à penicilina³⁰.

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* metacilina-resistente (MRSA) é realizado através de uma amostra de exsudado nasal colhida com zaragatoa. É realizado de imediato o exame cultural no meio cromogénico MRSM (Tabela 11) pela técnica de sementeira por quadrantes. A zaragatoa é posteriormente colocada em meio líquido Todd-Hewitt, que incuba à temperatura de 35 °C. Caso o exame cultural seja negativo passadas 24 horas, inocula-se um novo meio de MRSM com o meio líquido.

2.5.13. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

A estirpe *Streptococcus agalactiae* pertence ao grupo B do género *Streptococcus* e as infecções mais comuns causadas por este microrganismo são sépsis neonatal, pneumonia e meningite. A colonização do trato genital da mãe por este microrganismo está associada à colonização dos recém-nascidos e ao risco de doença neonatal, com a ocorrência de infecções agudas nos primeiros dias após o parto e de infecções latentes após a primeira semana de vida³⁰.

A pesquisa de *Streptococcus agalactiae* é uma análise de rotina realizada em grávidas às 34/35 semanas de gravidez, sendo aconselhável realizar até às 37 semanas de gravidez³⁰. Para esta pesquisa são necessárias duas zaragatoas, uma vaginal e uma retal. Ambas as zaragatoas são colocadas em meio líquido Todd-Hewitt, na estufa a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, o meio líquido é repicado para meio Granada e coloca-se uma lamela sobre a sementeira. Este meio incuba em atmosfera de anaerobiose à temperatura de 35 °C. Caso o *Streptococcus agalactiae* se encontre presente na amostra são visualizadas colónias de cor laranja no meio Granada.

No laboratório de Microbiologia são também recebidas, semanalmente, amostras provenientes da farmácia hospitalar para controlo das superfícies e dos preparados medicinais. As zaragatoas provenientes das diferentes superfícies são semeadas em meio SGC2 e meio PVX. Os preparados medicinais são semeados em meio GS (atmosfera de anaerobiose), meio SGC2 e meio PVX; os meios incubam à temperatura de 35 °C durante 24 horas.

2.5.14. Exame microscópico

No laboratório de Microbiologia o exame microscópico é frequentemente realizado nas lâminas coradas pela coloração de Gram ou pela coloração de Ziehl-Neelsen. O exame

microscópico pode ainda ser utilizado no despiste de contaminação da amostra com leveduras, na observação de parasitas nas fezes (subcapítulo 2.5.6.3.) e na confirmação do sedimento urinário.

2.5.14.1. Exame a fresco

O exame a fresco é realizado na suspeita de presença de leveduras no exame cultural. Para este exame é preparada uma lâmina com uma gota de água destilada, na qual são colocadas algumas colónias, espalhando de forma uniforme. De seguida é colocada uma lamela sobre o esfregaço e a lâmina é observada, de imediato, ao microscópio com a objetiva de 40x.

2.5.14.2. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a coloração mais utilizada no laboratório de Microbiologia e permite realizar a classificação fenotípica das bactérias (por exemplo, Gram-positivo, Gram-negativo e sua morfologia) e identificar a presença de leveduras⁵⁰. O resultado da coloração de Gram fornece rapidamente informações úteis tanto para o clínico, na seleção da terapia antimicrobiana a utilizar, como para o técnico de laboratório para direccionar o estudo da amostra³⁰. A coloração de Gram é realizada no equipamento AEROSPRAY, que realiza a coloração automaticamente.

É preparada uma lâmina com uma porção da amostra, ou no caso de fluidos corporais estéreis, é utilizada uma citocentrífuga para concentrar a amostra. O esfregaço seca ao ar e seguidamente a amostra na lâmina de vidro é fixada por aquecimento. A amostra é exposta ao cristal violeta (corante primário) e, em seguida, é adicionado o iodo para formar um complexo com o corante primário. Durante a descoloração com álcool ou acetona, o complexo formado entre o corante primário e o iodo é retido nos organismos Gram-positivo, mas perdido em organismos Gram-negativo, devido às características apresentadas pela parede celular de cada organismo. Os organismos Gram-positivo apresentam uma coloração púrpura, devido ao corante cristal de violeta (Figura 45a). Os organismos Gram-negativo ficam descolorados e é utilizado o contra-corante safranina para corar estes organismos apresentando como resultado final uma coloração vermelha (Figura 45b)^{30,50}. A correlação entre as observações resultantes da coloração de Gram com os resultados do exame cultural é uma boa técnica para verificar a qualidade da coloração e da cultura³⁰.

2.5.14.3. Coloração de Ziehl-Neelsen

A coloração de Ziehl-Neelsen é uma coloração ácida rápida baseada no facto de alguns organismos possuírem a capacidade de reter uma coloração primária mesmo quando expostos a agentes descolorantes fortes, como a mistura de ácidos com álcoois. Esta coloração é utilizada sobretudo para corar micobactérias e organismos ácido-resistentes⁵⁰.

Os organismos são corados com corante fucsina básica; para este corante ser absorvido é necessário o aquecimento da amostra. De seguida os organismos são descolorados com uma solução com álcool-ácido. As lâminas são coradas com azul de metileno para

obtenção de um fundo de contraste. Como resultado desta coloração os organismos álcool-ácido resistentes apresentam coloração vermelha, contrastando com um fundo azul claro (Figura 45c)⁵⁰.

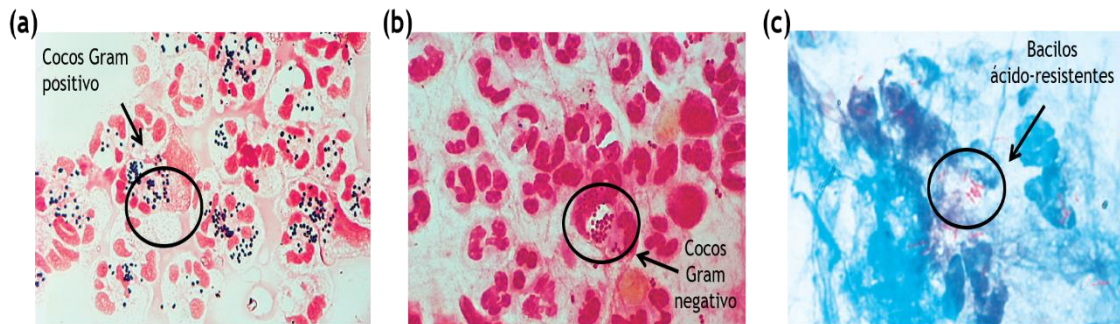


Figura 45. Colorações em Microbiologia. (a) Coloração de Gram de uma bactéria Gram-positivo; (b) Coloração de Gram de uma bactéria Gram-negativo; (c) Coloração de Ziehl-Neelsen (adaptado de McPherson R.A. et al., 2011)³⁰.

2.5.15. Serologia

São pesquisados três microrganismos no soro: a bactéria *Salmonella*, a bactéria *Brucella* e o vírus Epstein-barr. Estas três pesquisas são realizadas por testes de aglutinação e a interpretação dos resultados é baseada no mesmo fundamento. Nos testes de aglutinação, quando o anticorpo presente no soro do doente reage com o antigénio presente no reagente, é possível verificar uma aglutinação (precipitação das partículas) micro e macroscopicamente; assim, considera-se um resultado positivo quando é possível visualizar aglutinação, e considera-se que a pesquisa é negativa quando não é possível visualizar aglutinação.

2.5.15.1. Pesquisa de *Salmonella* no soro

A *Salmonella* é um género de bactérias bacilo Gram-negativo. A sua classificação é baseada nos três grandes grupos de antigénios: Ag O (polissacarídeo O somático), Ag K ou VI (antigénio presente na cápsula polisacarídica que envolve o Ag O) e Ag H (antigénio flagelar). Este género é transmitido ao ser humano por consumo de alimentos (como ovos e lacticínios) e água contaminados ou por transmissão fecal-oral. Esta bactéria pode ser causadora de gastroenterites, bacteriémia, septicémia, febre tifóide e paratifoide. A identificação dos serotipos baseia-se na deteção dos antigénios O (somático) e H (flagelar), por intermédio de reações de aglutinação com anti-soros específicos⁵⁰.

O teste Widal permite identificar a presença da bactéria *Salmonella* no soro. Este teste baseia-se numa reação de aglutinação entre anticorpos presente no soro do doente e o antigénio presente no reagente. Este teste destina-se à deteção do título de anticorpos contra a *Salmonella typhi* H, *Salmonella typhi* O e *Salmonella paratyphi* B, em soro humano. Se o resultado do teste serológico apresentar um título de Ag O elevado (>1:160) estamos perante uma infeção ativa; caso o título serológico do Ag H for elevado (>1:160) estamos perante uma situação de imunização ou de uma infeção prévia⁵⁰.

2.5.15.2. Pesquisa da bactéria *Brucella* no soro

As bactérias do género *Brucellaceae* são parasitas intracelulares obrigatórios, são aeróbios estritos e apresentam-se como cocobacilos curtos. Cada espécie está associada a um reservatório animal e o Homem está suscetível de ser infetado pelas estirpes *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos e roedores) e *B. canis* (cão). As estirpes podem ser diferenciadas pela pesquisa de antígenos de Wilson e Miles (A e M); apesar destes antígenos terem uma distribuição variável, o antígeno A é associado à estirpe *B. abortus*, enquanto que o antígeno M é dominante na estirpe *B. melitensis*⁵⁰.

Para a pesquisa serológica da bactéria *Brucella* podem ser realizados os testes Wright e Rosa de Bengala, ambos testes de aglutinação. O teste serológico Wright é específico para o anticorpo da *Brucella abortus*, uma vez que o reagente tem na sua composição o antígeno A. O teste serológico Rosa de Bengala permite determinar ambos os antígenos, A e M, não os discriminando.

2.5.15.3. Pesquisa serológica do vírus Epstein-barr

O vírus Epstein-barr, também conhecido com herpes vírus humano 4, é um vírus transmitido através da saliva e causa mononucleose infecciosa nos jovens e adultos, sendo que nas crianças a doença é assintomática ou ligeira. Os sintomas mais comuns são febre, mal-estar, fadiga, faringite, adenopatias e hepatoesplenomegália. Para a pesquisa do vírus utiliza-se um teste de aglutinação (Monoteste) onde é detetado o anticorpo Paul-Bunnell³⁰.

2.5.16. Testes preliminares de identificação

Os testes preliminares de identificação permitem fazer uma identificação presuntiva do microrganismo em estudo, de modo a orientar corretamente a identificação do microrganismo patológico. Os testes de identificação preliminares podem incluir a deteção da presença de uma enzima (catalase, coagulase, oxidase) ou a capacidade de resistir à presença de um antibiótico.

2.5.16.1. Prova da catalase

A maioria dos microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e microaerófilos utilizam a respiração aeróbica, onde o aceitador final de eletrões é o oxigénio. Durante este processo é produzido peróxido de hidrogénio, um metabolito tóxico. A acumulação deste metabolito resulta na morte dos microrganismos caso este não seja degradado enzimaticamente. A presença da enzima catalase permite a destruição do peróxido de hidrogénio segundo a reação $2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$, convertendo-o em água^{30,50}. A enzima catalase permite distinguir as bactérias Gram-positivo do género *Streptococcus* (catalase negativa) de bactérias dos géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria* (catalase positiva) (Figura 46)⁵⁰.

A presença da catalase é evidenciada pela observação imediata de bolhas gasosas quando se adicionam colónias ao reagente do teste ID color Catalase que contém peróxido de hidrogénio (H_2O_2)⁶¹.

2.5.16.2. Prova da coagulase

O microrganismo *Staphylococcus aureus* é diferenciado de outras espécies de estafilococos pela sua capacidade de produzir coagulase. A coagulase é uma enzima com capacidade de se ligar ao fibrinogénio plasmático, originando a aglutinação dos organismos e a coagulação do plasma. Foram identificadas duas formas da enzima geneticamente diferentes: uma ligada à parede celular (fator aglutinante) e outra na forma livre. A demonstração da produção da coagulase é o método de referência para a identificação presuntiva de *S. aureus*, que é a única espécie *Staphylococcus* coagulase positiva que é patogénica para o Homem³⁰.

Na prova da coagulase em lâmina é utilizado um reagente comercial constituído por partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais dirigidos para *S. aureus* que permitem a determinação da enzima ligada à parede celular (fator aglutinante) e proteína A (um componente estrutural). Na lâmina, são misturadas algumas colónias do microrganismo com uma gota do reagente comercial; se após 30 segundos se observar aglutinação o resultado é positivo³⁰. Sempre que se obtiver um resultado positivo é necessário realizar um controlo para garantir que não ocorreu autoaglutinação. O kit comercial possui um controlo e o procedimento é o mesmo que o realizado para o “reagente teste”. Se o controlo aglutinar, confirma-se que o microrganismo é *S. aureus*; caso no “teste controlo” não se verifique aglutinação, o resultado deve ser indicado como “insuficiente para a determinação da natureza da coagulase” (Figura 46).

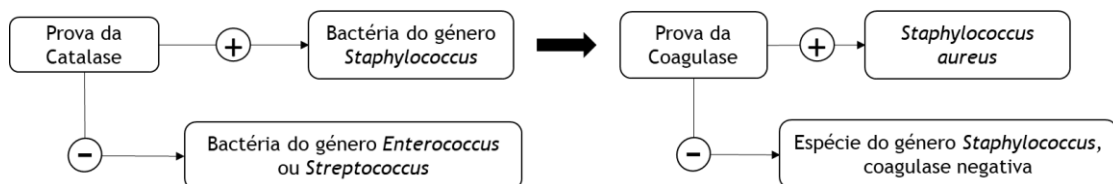


Figura 46. Fluxograma da prova da catalase e da prova da coagulase e interpretação dos seus resultados.

2.5.16.3. Teste da oxidase

A citocromo oxidase (complexo IV da cadeia transportadora de eletrões) é uma enzima que transporta eletrões do citocromo C para o oxigénio molecular reduzindo-o a água. Na presença de oxigénio molecular, o sistema citocromo oxidase/citocromo C tem a capacidade de reduzir substâncias orgânicas³⁰. A pesquisa da enzima citocromo C oxidase permite diferenciar as espécies pertencentes ao género *Enterobacteriaceae* (oxidase negativa) da maioria das espécies pertencentes ao género *Pseudomonas* (oxidase positiva); as bactérias do género *Neisseria* também são produtoras da enzima citocromo C oxidase (oxidase positiva)⁵⁰.

2.5.16.4. Teste de resistência à Novobiocina

Existem várias espécies de estafilococos coagulase-negativa, sendo as mais importantes na prática clínica o *S. epidermidis* e o *S. saprophyticus*, que podem ser diferenciados por um teste de sensibilidade ao antibiótico novobiocina. Este teste tem como aplicação orientar o estudo microbiano para a identificação presuntiva de estafilococos coagulase negativa, permitindo diferenciar *S. epidermidis* (sensível à novobiocina) de *S. saprophyticus* (resistente)³⁰.

É necessário realizar uma suspensão de colônias em estudo em NaCl a 0,85% com a concentração de 0,5 MacFarland. A partir desta suspensão é inoculado um meio Muller Hinton pela técnica de sementeira em rede, colocando de seguida um disco do antibiótico novobiocina; este meio incuba à temperatura e 37 °C durante 24 horas. Se após incubação for possível identificar um halo de inibição superior a 16 mm em redor do disco, verifica-se a presença de um microrganismo sensível à novobiocina, presumindo a presença da estirpe *S. epidermidis*; caso seja possível identificar um halo de crescimento em redor do disco verifica-se a presença de um microrganismo resistente à novobiocina, presumindo-se que seja a estirpe *S. saprophyticus*.

2.5.16.5. Tipagem de *Streptococcus* B-hemolíticos

Para a tipagem de estreptococos B-hemolíticos é utilizado um teste rápido de aglutinação (SSI® Streptococcus Latex Group Kit) que permite identificar os microrganismos *Streptococcus* B-hemolíticos dos grupos A, B, C, D, F e G da classificação de Lancefield. Os microrganismos *Streptococcus* B-hemolíticos contêm antigénios específicos, que após a sua extração reagem com os anticorpos presentes nos diferentes anti-soros, permitindo assim identificar o serogrupo a que pertencem. Os anti-soros são constituídos por anticorpos específicos de cada serogrupo conjugados com partículas de látex; quando ocorre interação dos antigénios com os anticorpos correspondentes é produzida uma aglutinação visível macroscopicamente que determina o resultado positivo para um determinado serogrupo³⁰.

Assim:

- Resultado positivo é definido como o aparecimento de uma aglutinação nítida num dos anti-soros; podem ocorrer o aparecimento de aglutinação intensa em mais que um anti-soro, este resultado pode indicar uma mistura de grupos ou a presença de uma estirpe auto-aglutinável.
- Resultado negativo é definido como a ausência de aglutinação.

2.5.16.6. Teste da Optoquina

O teste de sensibilidade ao antibiótico optoquina permite fazer uma distinção presuntiva entre as estirpes α -hemolíticos de *Streptococcus pneumoniae*, sensíveis à optoquina, e outras estirpes de *Streptococcus* α -hemolíticos, resistentes à optoquina³⁰.

Este teste é realizado num meio sólido de gelose sangue, em que após a sementeira é colocado um disco de optoquina e incuba durante 24 horas a 35 °C. Se for possível observar

uma zona de inibição de crescimento em redor do disco conclui-se que se estamos perante uma estirpe de *Streptococcus pneumoniae*⁵⁰.

2.5.16.7. Teste dos fatores V, X e VX

Este teste permite realizar a identificação do microrganismo *Haemophilus influenzae*; este microrganismo necessita que estejam presentes no meio os fatores de crescimento X e V, em simultâneo, para ocorrer crescimento. Neste teste é utilizado um meio de Muller Hinton, que não contém os fatores de crescimento necessários para que ocorra crescimento do microrganismo *Haemophilus*^{30,50}.

O meio Muller Hinton é inoculado por sementeira em rede e de seguida colocam-se os discos dos fatores de crescimento V, X e VX. Os discos dos fatores devem ser dispostos em triângulo e ligeiramente afastados para que não ocorra sobreposição dos fatores. O meio incuba durante 24 horas a 35 °C; se após a incubação for possível visualizar crescimento microbiano apenas em redor do disco XV é identificado o microrganismo *H. influenzae*; por outro lado, se o crescimento microbiano se verificar em redor dos discos XV e V é identificado o microrganismo *H. parainfluenzae*³⁰.

2.5.16.8. Teste de hidrólise da ureia

Este teste baseia-se na capacidade de algumas bactérias conseguirem decompor a ureia através da enzima urease. Este teste tem principal aplicação no estudo de gastroenterites, permitindo diferenciar os microrganismos *Salmonella* (urease negativa), agente provocador de gastroenterite, e *Proteus* (urease positiva), uma vez que ambas as espécies produzem ácido sulfídrico originando colónias com um ponto negro no meio de SS⁵⁰.

A presença da urease pode ser demonstrada inoculando o meio de ureia com o microrganismo a estudar e verificar se este se torna alcalino (vermelho), devido à produção de amoníaco, através da mudança do indicador vermelho de fenol. Quando a enzima urease não está presente o meio permanece com coloração rosa.

2.5.16.9. Pesquisa de B-lactamases (Nitrocefina)

As B-lactamases são enzimas bacterianas com capacidade de hidrolisar e inibir os antibióticos B-lactâmicos, que atuam sobre a parede celular bacteriana⁵⁰. A pesquisa de B-lactamases é útil na deteção de enzimas penicilinase em espécies Gram-positivo e algumas espécies Gram-negativo. Podem ser utilizados três tipos de testes diretos para detetar a presença de B-lactamases: acidométrico, iodométrico e cromogénico. O teste utilizado no laboratório é o teste cromogénico que tem como princípio base a hidrólise da cefalosporina cromogénica (nitrocefina) detetada pela alteração de cor do disco³⁰.

Para esta pesquisa coloca-se um disco de cefinase sobre uma lâmina e humidifica-se com uma gota de água; com uma ansa estéril retiraram-se algumas colónias isoladas e colocam-se na superfície do disco e observa-se se ocorre mudança de cor. No caso de não ocorrer mudança de cor, a pesquisa de B-lactamases é negativa. No caso de se verificar mudança de cor de amarelo para vermelho na zona onde foram colocadas as colónias, a

pesquisa de β -lactamases é positiva, podendo estar presente os seguintes microrganismos: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis* e *Enterococcus faecalis* (Tabela 17)³⁰.

Tabela 17. Interpretação dos resultados da pesquisa de β -lactamases.

Microrganismo	Resultado	Tempo de reação	Interpretação
<i>Haemophilus influenzae</i>	Positivo	1 min.	Resistente à ampicilina. Sensível às cefalosporinas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Moraxella catarrhalis</i>	Positivo	1 min.	Resistente à penicilina
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positivo	5 min.	Resistente à penicilina e à ampicilina

2.5.17. Identificação de microrganismos e antibiograma

A identificação de todos os microrganismos isolados no decorrer do estudo de cada amostra é realizada no equipamento *VITEK*[®], bem como a maioria dos antibiogramas. Este equipamento tem disponível cartas de identificação e cartas de antibiograma que são selecionadas tendo em conta todas as características do microrganismo em estudo, desde o exame microscópico aos testes intermédios de identificação microbiana.

As cartas de identificação possuem poços com determinados elementos bioquímicos (açúcares), que quando são fermentados pelo microrganismo originam a alteração da cor do poço. O *software* do equipamento atribui um bionúmero que identifica a espécie e a subespécie do microrganismo com base nos diferentes tipos de substratos fermentados⁶².

As cartas de antibiograma, ou antifungigrama conforme o microrganismo em estudo, possuem nos seus poços diversos antibióticos/antifúngicos com diferentes concentrações, permitindo identificar que antibióticos são eficazes no tratamento da infeção provocada por aquele microrganismo. O crescimento microbiano na presença de antibiótico é detetado pelo aumento de turvação do poço e é indicativo de resistência ao antibiótico. A interpretação do resultado do antibiograma tem em consideração a concentração mínima inibitória (MIC). O equipamento *VITEK*[®] possui um leitor/incubador onde se encontram as cartas cheias com amostra num ambiente com temperatura controlada. Este leitor/incubador é composto por sensores fotométricos que realizam a leitura dos diferentes poços de hora a hora, detetando as alterações na cor e na turvação⁶².

Para este processo é necessário realizar uma suspensão com colónias puras numa solução salina estéril. A suspensão deve ter uma determinada concentração, definida na escala de McFarland, consoante o microrganismo em estudo. Diariamente é realizado um controlo de esterilidade da solução salina (controlo interno), no qual é inoculado um meio GS com a solução salina e após 24 horas de incubação a 35°C deve-se verificar ausência de crescimento bacteriano⁶².

Quando não está disponível a carta comercial para realizar o antibiograma do microrganismo no equipamento *VITEK*[®] este é realizado manualmente. Nos antibiogramas manuais é utilizado o meio Mueller Hinton (MHE) ou o meio Mueller Hinton enriquecido com

sangue (MHF), e, tal como nas cartas de antibiograma comerciais, os antibióticos a testar devem ser escolhidos de acordo com o seu espectro de ação e as suas propriedades farmacocinéticas. A preparação da suspensão é realizada do mesmo modo descrito acima, porém a concentração da solução deve ser o mais perto possível de 0,5 McFarland. O meio é inoculado com uma zaragatoa carregada de inóculo e a sementeira é realizada em rede. Seguidamente, os discos dos antibióticos em estudo são colocados na superfície da placa de agar, com alguma distância de modo a não ocorrer interferência das zonas de inibição. A interpretação das zonas de inibição é realizada comparando o diâmetro e a MIC com as MIC *standard* relacionadas com os níveis sanguíneos habitualmente atingidos com doses terapêuticas dos antibióticos.

O estudo do antibiograma permite fazer três interpretações do nível da resistência do microrganismo quando sujeito à ação de um antibiótico: sensível, intermédia e resistente. Um microrganismo é sensível a um antibiótico quando a infeção causada por este pode ser tratada com a dose recomendada do antibiótico. Um antibiótico tem uma ação intermédia quando é observada inibição do crescimento microbiano mas a dose terapêutica não causa a inibição esperada. Este resultado sugere que uma terapia com uma dose mais elevada do antibiótico seria eficaz. Caso não esteja disponível outro antibiótico ou não seja recomendado aumentar a dose terapêutica, a sensibilidade ao antibiótico deve ser testada por testes de diluição. Um microrganismo é resistente a um antibiótico quando o seu crescimento não é inibido por concentrações terapêuticas do fármaco³⁰.

2.5.17.1. Confirmação da resistência à colistina

A colistina é um antibiótico de última linha terapêutica, apresenta elevada toxicidade e é utilizado em infeções por bactérias Gram-negativo multirresistentes³⁰. A resistência e sensibilidade à colistina é sempre confirmada por determinação da MIC pelo método de microdiluição em meio líquido.

É preparada uma suspensão de colónias em solução salina com concentração de 0,5 McFarland, desta suspensão são retirados 50 µL e inocula-se um meio Mueller Hinton líquido. Do meio Mueller Hinton inoculado com a suspensão de colónias puras são retirados 100 µL e colocados em cada poço de uma galeria com diferentes concentrações do antibiótico colistina. A galeria incuba a atmosfera normal, a 35 °C durante 24 horas; após a incubação observa-se se existe turvação nos diferentes poços, confirmando se o microrganismo é sensível ou resistente ao antibiótico colistina.

2.6. Medidas de Segurança no Laboratório

Todos os laboratórios sediados no CHUCB regem-se pelo manual de Segurança Biológica da instituição, que tem como objetivo diminuir os riscos associados à exposição a material biológico e agentes infecciosos. Neste manual encontram-se as noções básicas de segurança para trabalhar num laboratório com práticas de risco, recomendações de boas

práticas clínicas, proteção do indivíduo e do meio que o rodeia, bem como indicações de procedimento caso ocorra algum incidente.

As fichas de segurança de todos os produtos utilizados no laboratório estão disponíveis na intranet do hospital (<http://intranet.chcbeira.pt>), disponível para qualquer pessoa autorizada.

O LPC em cada secção dispõe de cartazes com os vários grupos de risco biológico associado aos resíduos hospitalares. O laboratório possui dispositivos de segurança pessoal, como óculos de proteção e luvas, possui dispositivos de emergência como é o caso do chuveiro de emergência, do lava-olhos de emergência e da manta de incêndio. Por todo o laboratório encontram-se contentores de lixo com sacos de acordo com os resíduos a colocar. **Sacos brancos** destinam-se a resíduos contaminados por amostras biológicas ou reagentes, exemplos são luvas, pipetas de Pasteur, pontas de micropipetas, tampas de tubos primários. **Sacos vermelhos** destinam-se aos reagentes dos equipamentos. **Sacos pretos** destinam-se a resíduos não contaminados, como material de escritório, caixas exteriores de reagentes. Existe ainda uns contentores amarelos, nas bancadas, destinados a material cortante e contaminado quer por amostras biológicas, reagentes ou outras soluções.

2.7. Controlo de Qualidade

2.7.1. Controlo Interno e Controlo Externo

A validação analítica/técnica dos resultados é a verificação da conformidade da execução dos procedimentos adotados e do Controlo de Qualidade Interno. Este último permite verificar as condições locais de utilização, garantindo a qualidade, reprodutibilidade e fiabilidade dos procedimentos. Esta validação é realizada pelo responsável que efetua a análise⁶³.

O controlo de qualidade interno avalia as diferentes fases do processo analítico, até à obtenção dos resultados. Este controlo é efetuado antes ou em simultâneo com as amostras biológicas, tendo em conta a técnica executada. A finalidade do controlo é avaliar a exatidão, precisão e coeficiente de variação, como critérios de aceitação ou rejeição do resultado; para tal, os valores obtidos são comparados com valores definidos, normalmente, pela casa comercial. A frequência com que o controlo interno é processado é, geralmente, indicado pela casa comercial, tendo em conta a técnica a realizar, os parâmetros a dosear e a bioestabilidade dos mesmos⁶³.

O controlo de qualidade externo tem como objetivo a “avaliação externa da qualidade”. Este controlo é processado como uma amostra seguindo os processos habituais do laboratório e os resultados obtidos são enviados para a entidade responsável que os analisa. Os eventuais erros/desvios são analisados e registados no relatório, que é posteriormente enviado para o LPC. Os relatórios são depois arquivados e sempre que necessário são tomadas ações corretivas, com o objetivo de resultar no aperfeiçoamento, manutenção ou monitorização crítica do método/equipamento. Geralmente, o controlo de qualidade externo

é processado mensalmente ou trimestralmente, podendo a sua frequência variar, a periodicidade do seu processamento é definida pelo laboratório⁶³.

Tanto o controlo interno como o externo só são processados no equipamento após a correta manutenção do mesmo, seguindo o seguinte processo: verificação e manutenção do equipamento, preparação dos reagentes, calibração e controlo⁶³.

2.7.2. Validação dos Resultados

A validação biopatológica é definida como o controlo da verosimilhança e da coerência do conjunto de análises efetuadas para um utente, tendo em conta o seu estado clínico, os tratamentos de que foi alvo e os resultados anteriores. A validação biopatológica é realizada por um patologista clínico ou por um técnico superior de saúde⁶⁴.

Para esta validação é necessário avaliar múltiplos parâmetros relativos ao utente, tais como a compatibilidade dos resultados da análise, a patologia subjacente, as variações no estado clínico do utente, bem como resultados de análises realizadas anteriormente. Este procedimento realiza-se quando o pedido de análise se encontra totalmente satisfeito, verificando sempre a sua concordância e compatibilidade dos resultados⁶⁴.

Referências bibliográficas

- 1 Pawlotsky, J.-M. *et al.* EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *Journal of hepatology* **69**, 461-511 (2018).
- 2 Graziadei, I., Pirenne, J., Valdecasas, J. C., Muiesan, P. & Samuel, D. Recomendações da EASL para o tratamento da hepatite C de 2015. *Journal of Hepatology* **63**, 199-236 (2015).
- 3 Ansaldi, F., Orsi, A., Sticchi, L., Bruzzone, B. & Icardi, G. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World journal of gastroenterology: WJG* **20**, 9633-9652 (2014).
- 4 van Tilborg, M. *et al.* HCV core antigen as an alternative to HCV RNA testing in the era of direct-acting antivirals: retrospective screening and diagnostic cohort studies. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **3**, 856-864 (2018).
- 5 Manns, M. P. *et al.* Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 17006 (2017).
- 6 Negro, F. *et al.* Extrahepatic morbidity and mortality of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **149**, 1345-1360 (2015).
- 7 Khaderi, S., Shepherd, R., Goss, J. A. & Leung, D. H. Hepatitis C in the pediatric population: transmission, natural history, treatment and liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **20**, 11281-11286 (2014).
- 8 Fourati, S., Feld, J. J., Chevaliez, S. & Luhmann, N. Approaches for simplified HCV diagnostic algorithms. *Journal of the International AIDS Society* **21**, e25058 (2018).
- 9 Smith, B. D. *et al.* Hepatitis C virus testing of persons born during 1945-1965: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention. *Annals of internal medicine* **157**, 817-822 (2012).
- 10 Galli, C., Julicher, P. & Plebani, M. HCV core antigen comes of age: a new opportunity for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* **56**, 880-888 (2018).
- 11 Rockstroh, J. K. *et al.* HCV core antigen as an alternate test to HCV RNA for assessment of virologic responses to all-oral, interferon-free treatment in HCV genotype 1 infected patients. *Journal of virological methods* **245**, 14-18 (2017).
- 12 Heim, M. H. & Thimme, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *Journal of hepatology* **61**, S14-S25 (2014).
- 13 Moradpour, D., Grakoui, A. & Manns, M. P. Future landscape of hepatitis C research-Basic, translational and clinical perspectives. *Journal of hepatology* **65**, S143-S155 (2016).
- 14 Ganta, N. M. *et al.* A review on HCV inhibitors: Significance of non-structural polyproteins. *European journal of medicinal chemistry* (2018).
- 15 Klein, S. L. Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and treatments for viral diseases. *Bioessays* **34**, 1050-1059 (2012).
- 16 Hayashida, K. *et al.* 17 β -estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiology and immunology* **54**, 684-690 (2010).
- 17 Mahmoudvand, S., Shokri, S., Taherkhani, R. & Farshadpour, F. Hepatitis C virus core protein modulates several signaling pathways involved in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology* **25**, 42-58 (2019).
- 18 McGivern, D. R. & Lemon, S. M. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene* **30**, 1969-1983 (2011).
- 19 Rusyn, I. & Lemon, S. M. Mechanisms of HCV-induced liver cancer: what did we learn from in vitro and animal studies? *Cancer letters* **345**, 210-215 (2014).
- 20 Peterson, J. *et al.* Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative 'window' phase of hepatitis C infection. *Vox sanguinis* **78**, 80-85 (2000).
- 21 Lamoury, F. M. J. *et al.* Hepatitis C virus core antigen: a simplified treatment monitoring tool, including for post-treatment relapse. *Journal of Clinical Virology* **92**, 32-38 (2017).
- 22 Gonçalves, D., Amaro, A., Faria, M. C. & Rodrigues, D. Hepatitis C virus core antigen quantification as an alternative method for infection diagnosis. *11ª Reunião Científica da Sociedade Portuguesa de Medicina Laboratorial* (2019).

23 Alonso, R. *et al.* HCV core-antigen assay as an alternative to HCV RNA quantification: A correlation study for the assessment of HCV viremia. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)* **36**, 175-178 (2018).

24 Rodrigues, D., Gouveia, P. & Faria, M. C. Influência do género na virémia de pacientes infetados com o vírus da hepatite C. *Congresso de Infeciologia 2016*.

25 Vanhommerig, J. W. *et al.* Evaluation of a hepatitis C virus (HCV) antigen assay for routine HCV screening among men who have sex with men infected with HIV. *Journal of virological methods* **213**, 147-150 (2015).

26 Ottiger, C., Gygli, N. & Huber, A. R. Detection limit of architect hepatitis C core antigen assay in correlation with HCV RNA, and renewed confirmation algorithm for reactive anti-HCV samples. *Journal of Clinical Virology* **58**, 535-540 (2013).

27 Freiman, J. M. *et al.* Hepatitis C core antigen testing for diagnosis of hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine* **165**, 345-355 (2016).

28 Garbuglia, A. R. *et al.* HCV core antigen and HCV-RNA in HIV/HCV co-infected patients with different HCV genotypes. *BMC infectious diseases* **14**, 222 (2014).
29 <http://www.chcbeira.pt/>. consultado em 18 de outubro de 2018.

30 McPherson, R. A. & Pincus, M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd edn, (Elsevier Health Sciences, 2011).

31 <https://www.roche.com/products/product-details.htm?productId=709134a4-bbd6-4e4a-86a0-627b22a52e4a>. consultado a 18 de outubro de 2018.

32 https://usdiagnostics.roche.com/en/core_laboratory/instrument/cobas-6000-analyzer-series.html#performance. consultado a 19 de outubro de 2018.

33 <https://usdiagnostics.roche.com/forher/cobase411.html>. consultado a 22 de outubro de 2018.

34 Roche, D. Operator's manual cobas e 411 analyzer.

35 <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/architect/architect-i2000SR>. consultado a 22 de outubro de 2018.

36 Prince, H. E. & Lapé-Nixon, M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clinical and Vaccine Immunology* **21**, 1377-1384 (2014).

37 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12390001>. consultado em 22 de outubro de 2018.

38 <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>. consultado a 22 de outubro de 2018.

39 <http://www.phadia.com/en-GB/5/Autoimmunity-Tests/Test-Principle-ImmunoCAP-Specific-IgA/>. consultado a 22 de outubro de 2018.

40 <https://usdiagnostics.roche.com/en/instrument/cobas-4800-system.html>. consultado a 24 de outubro de 2018.

41 <https://lifescience.roche.com/documents/MagNA-Pure-Compact-System-Versatile-Nucleic-Acid-Purification.pdf>. consultado a 7 de novembro de 2018.

42 <https://www.menariniagnostics.com/en-us/Home/Laboratory-products/Urine-Sediment>. consultado a 25 de outubro de 2018.

43 Menarini, A. Uriflet S. (Emitido em 2003. Revisão em 2016).

44 vircell. Bula laboratorial para diagnóstico *in vitro* de Coxiela burnetii I+II IFA

45 vircell. Bula laboratorial para diagnóstico *in vitro* de Rickettsia conorii IFA IgG.

46 Sebastian, C. & William, H. Immunochromatography: Formats and Applications. *Journal of Pharmaceutical Research* **6** (2016).

47 Hoffbrand, A. V. & Moss, P. A. H. *Fundamentos em hematologia de Hoffbrand*. 7 edn, (Artmed Editora, 2018).

48 Hoffbrand, A. V. & Moss, P. A. H. *Fundamentos em Hematologia*. 6 edn, (Artmed Editora, 2013).

49 Prescrição e determinação do hemograma (Norma nº 063/2011, atualizada a 12/09/2013). *Direção Geral de Saúde*.

50 Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical Microbiology*. 8 edn, (Elsevier Health Sciences, 2016).

51 <http://soranadia.blogspot.com/2015/10/esfregaço-sanguineo.html>. consultado a 30/01/2019.

- 52 Bain, B. J., Clark, D. M. & Wilkins, B. S. *Bone Marrow Pathology*. Fourth edn, (Wiley-Blackwell, 2010).
- 53 Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c (Norma nº 033/2011 de 30/09/2011, atualizada a 6/12/2012). *Direção Geral de Saúde*.
- 54 http://www.arkray.global/english/upload/docs/ha_8180t.pdf. consultado a 3/02/2019.
- 55 Bio-Sciences, G. H. *Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography*.
- 56 Kunwandee, J., Srivorakun, H., Fucharoen, G., Sanchaisuriya, K. & Fucharoen, S. ARKRAY ADAMS A1c HA-8180T Analyzer for diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies common in Southeast Asia. *Laboratory medicine* **45**, e112-e121 (2014).
- 57 Casso, G., Lanzi, F. & Marcucci, C. E. in *Perioperative Hemostasis* 45-63 (Springer, 2015).
- 58 Zoller, B., de Frutos, P. G., Hillarp, A. & Dahlback, B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica* **84**, 59-70 (1999).
- 59 Cepheid. GeneXpert HemosIL Fil and FV. (2017).
- 60 <https://www.instrumentationlaboratory.com/en/hemosil-reagents>. consultado a 29/01/2019.
- 61 <https://www.biomerieux.pt/>. consultado a 17/04/2019.
- 62 bioMérieux. VITEK 2™ - technology Manual do Utilizador do Software. (2013).
- 63 Processo analítico (CHCB.PI.PATCLI.02). *Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE*.
- 64 Processo pós-analítico (CHCB.PI.PATCLI.03). *Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE*.

Anexo I - Valores de carga viral extrapolados pelo modelo linear.

ID	VHC RNA	VHC RNA (UI/mL)	Log (VHC RNA)	VHC Ag (fmol/L)	Log (VHC Ag)	VHC RNA (Y=0,731.x-1,109)	Δ VHC RNA
1	Detetável	405000,0	5,61	855,04	2,93	5,53	0,08
2	Detetável	157,0	2,20	4,84	0,68	2,45	0,25
3	Detetável	20,3	1,31	5,49	0,74	2,53	1,22
4	Detetável	1420000,0	6,15	969,14	2,99	5,60	0,55
5	Detetável	5160000,0	6,71	6608,78	3,82	6,74	0,03
6	Detetável	3090000,0	6,49	3289,41	3,52	6,33	0,16
7	Detetável	29700000,0	7,47	34785,73	4,54	7,73	0,26
8	Detetável	35500,0	4,55	80,37	1,91	4,12	0,43
9	Detetável	5140000,0	6,71	8873,63	3,95	6,92	0,21
10	Detetável	2070000,0	6,32	3441,90	3,54	6,36	0,04
11	Detetável	4470000,0	6,65	11700,51	4,07	7,08	0,43
12	Detetável	358000,0	5,55	616,43	2,79	5,33	0,22
13	Detetável	3930000,0	6,59	5745,92	3,76	6,66	0,07
14	Detetável	2530000,0	6,4	2846,62	3,45	6,24	0,16
15	Detetável	9090000,0	6,96	14406,43	4,16	7,21	0,25
16	Detetável	6770000,0	6,83	7350,93	3,87	6,81	0,02
17	Detetável	11300000,0	7,05	12582,05	4,10	7,13	0,08
18	Detetável	86,6	1,94	3,34	0,52	2,23	0,29
19	Detetável	2050000,0	6,31	2729,30	3,44	6,22	0,09
20	Detetável	1260000,0	6,1	2051,91	3,31	6,05	0,05
21	Detetável	5780000,0	6,76	5993,93	3,78	6,68	0,08
22	Detetável	3180000,0	6,5	7178,28	3,86	6,79	0,29
23	Detetável	1100000,0	6,04	2465,22	3,39	6,16	0,12
24	Detetável	14800000,0	7,17	10255,45	4,01	7,00	0,17
25	Detetável	8610,0	3,93	13,47	1,13	3,06	0,87
26	Detetável	3770000,0	6,58	3336,5	3,52	6,34	0,24
27	Detetável	1080000,0	6,03	3765,01	3,58	6,41	0,38
28	Detetável	3720000,0	6,57	7025,86	3,85	6,78	0,21
29	Detetável	2730000,0	6,44	4366,36	3,64	6,50	0,06
30	Detetável	7350000,0	6,87	18846,08	4,28	7,37	0,50
31	Detetável	3830000,0	6,58	5849	3,77	6,67	0,09
32	Detetável	954000,0	5,98	1745,58	3,24	5,95	0,03
33	Detetável	15400000,0	7,19	19574,18	4,29	7,39	0,20
34	Detetável	112,0	2,05	2,4	0,38	2,04	0,01
35	Detetável	2730000,0	6,44	4423,85	3,65	6,50	0,06
36	Detetável	1690,0	3,23	2,67	0,43	2,10	1,13
37	Detetável	277000,0	5,44	635,07	2,80	5,35	0,09
38	Detetável	116000,0	5,06	152,16	2,18	4,50	0,56
39	Não detetável	-	-	2,89	0,46	2,15	2,15
40	Detetável	<15	-	1,01	0,00	1,52	1,52

Anexo II - Preparação do meio de tetracionato.

Num balão volumétrico de 1000 mL adicionar 23 gramas de tetracionato e 500 mL de água destilada e agitar ligeiramente. De seguida colocar o balão volumétrico sobre a placa térmica até a solução começar a borbulhar (levantar fervura). Durante o processo de aquecimento deve-se agitar periodicamente o balão volumétrico.