

Relatório de Estágio

Relatório de Estágio Curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e Estudo de Caso de um Doente com Mieloma Múltiplo

Daniela Sofia Alves Nunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Dr^a Paula Alexandra da Cunha Caseiro
Co-orientadora: Professora Doutora Ana Mafalda Loureiro Fonseca

agosto de 2022

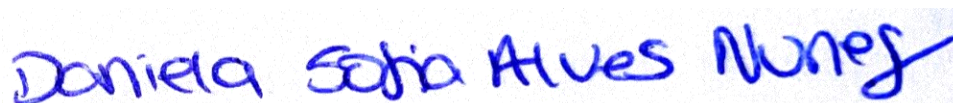
Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Daniela Sofia Alves Nunes, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10975 do Mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

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

Universidade da Beira Interior, Covilhã 24 /06 /2022



Folha em branco

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Ana Mafalda Loureiro Fonseca por ter aceitado ser minha co-orientadora e por toda a ajuda, disponibilidade, simpatia e compreensão que em todos os momentos demonstrou.

À Dr^a Paula Alexandra da Cunha Caseiro pela forma como me acolheu e orientou durante estes meses de estágio. Por toda a compreensão, ajuda, paciência, disponibilidade, motivação e amizade.

À Doutora Alice Mendes, Doutor Nuno Silva, Doutora Cristiana Canha e Doutora Ana Isabel Rodrigues pela excelente orientação e acompanhamento constante. Por todos os ensinamentos que me foram transmitidos, o meu muito obrigada!

A toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, em especial ao Doutor Fernando Rodrigues pela possibilidade de realizar o estágio neste serviço.

Agradeço também a todos os professores que fizeram parte do meu percurso ao longo do mestrado, por tudo o que me ensinaram.

Aos meus amigos, do Fundão e de Coimbra pela força que me deram e por ter o privilégio de partilhar esta jornada bonita da minha vida.

Um agradecimento especial ao meu melhor amigo e namorado, Rafael, por todo o apoio, motivação e amor. Obrigada por acreditares em mim e por estares sempre comigo, nos bons e maus momentos.

Agradeço à minha família por sempre acreditarem nos meus sonhos e me darem força. E à minha irmã, Mariana, por ser a melhor irmã do mundo.

Por fim, quero agradecer aos meus pais por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem incondicionalmente. Obrigada a ti Mãe que tornaste este meu sonho realidade, mais uma vez. Obrigada pela tua força, pelo teu amor puro e por seres sempre a minha melhor amiga.

Folha em branco

Resumo

No presente relatório são descritas as atividades realizadas durante os oito meses do estágio curricular realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), no âmbito do Mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

O estágio abrangeu as principais valências de um laboratório de análises clínicas: a Hematologia, Imunologia, Microbiologia e Bioquímica. Este relatório foca, essencialmente, as metodologias características de cada um destes setores e os parâmetros analíticos mais solicitados na rotina de um laboratório hospitalar.

De modo a evidenciar a importância do diagnóstico laboratorial, tendo em conta os vários setores do laboratório de patologia clínica, foi incluído no presente relatório um estudo de caso de um doente com Mieloma Múltiplo.

O estágio foi uma experiência enriquecedora e permitiu-me adquirir competências científicas relativas à execução de técnicas analíticas utilizadas nas diferentes áreas do laboratório de patologia clínica.

Palavras-chave

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; Ciências Biomédicas; Laboratório; Análises; Hematologia; Imunologia; Microbiologia; Bioquímica; Mieloma Múltiplo; Patologia Clínica

Folha em branco

Abstract

This report describes the activities undertaken under the period of eight months during the curricular internship carried out at the Hospital and University Center of Coimbra (CHUC), under the Master's Degree in Biomedical Sciences at the Faculty of Health Sciences from University of Beira Interior.

The internship covered all the valences of a clinical analysis laboratory: Hematology, Immunology, Microbiology and Biochemistry. This report focuses, essentially, on the characteristic methodologies of each of these sectors and the most requested analytical parameters in the routine of a hospital laboratory.

In order to highlight the importance of laboratory diagnosis, taking into account the various sectors of the clinical pathology laboratory, a case study of a patient with Multiple Myeloma was included in this report.

The internship was an enriching experience and allowed me to acquire scientific skills related to the execution of analytical techniques used in different areas of the clinical pathology laboratory.

Keywords

Hospital and University Center of Coimbra; Biomedical Sciences; Laboratory; Analysis; Hematology; Immunology; Microbiology; Biochemistry; Multiple Myeloma; Clinical Pathology

Folha em branco

Índice

Parte 1- Relatório de Estágio	1
1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório.....	2
2.1. Fase Pré-Analítica.....	3
2.2. Fase Analítica.....	5
2.3. Fase Pós-Analítica.....	5
2.4. Controlo de Qualidade	6
3. Setor de Hematologia	7
3.1. Hemograma	8
3.1.1. Eritrograma.....	9
3.1.2. Leucograma.....	10
3.1.3. Plaquetograma	10
3.2. Metodologias associadas ao hemograma.....	11
3.3. Esfregaço de Sangue Periférico	17
3.4. Velocidade de Sedimentação	19
3.5. Hemostase	20
3.6. Metodologias associadas à hemostase.....	21
3.6.1. Testes de <i>Screening</i> de Coagulação	22
3.7. Cariótipo	24
4. Setor de Imunologia	25
4.1. Metodologias usadas em imunodiagnóstico.....	27
4.1.1. Nefelometria.....	27
4.1.2. Turbidimetria	28
4.1.3. Eletroforese Capilar	29
4.1.4. Imunofixação	30
4.1.5. Caracterização de Proteinúrias	33
4.1.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	34

4.1.7.	Imunodifusão Radial	35
4.1.8.	Reação de <i>Waller-Rose</i>	36
4.1.9.	Isofocalização	37
4.1.10.	Espectrometria de Massa em Tandem.....	37
4.1.11.	Imunoensaio Enzimático de Fluorescência (FEIA)	38
4.1.12.	Imunofluorescência Indireta (IFI).....	39
4.1.13.	Radioimunoensaio (RIA)	40
4.1.14.	Quimioluminescência (CLIA)	40
4.1.15.	<i>Immunoblotting</i>	41
4.2.	Estudo de Gamapatias Monoclonais	42
4.3.	Patogénese Autoimune.....	43
4.4.	Estudo e Monitorização de Doenças Autoimunes (DAIs)	43
5.	Setor de Microbiologia	47
5.1.	Bacteriologia.....	49
5.1.1.	Diagnóstico laboratorial em bacteriologia.....	49
5.1.2.	Produtos biológicos	50
5.1.3.	Metodologias de identificação em bacteriologia	56
5.2.	Micobacteriologia.....	59
5.3.	Micologia	62
5.4.	Parasitologia.....	64
5.5.	Serologia.....	66
6.	Setor de Bioquímica	67
6.1.	Metodologias utilizadas no setor de Bioquímica.....	69
6.1.1.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	69
6.1.2.	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MSMS)	70
6.2.	Parâmetros analisados	70
6.3.	Bioquímica Urinária.....	77
Parte 2- Estudo de caso de um doente com Mieloma Múltiplo: importância do diagnóstico laboratorial tendo em conta os vários setores do Laboratório de Patologia Clínica.....		
		79
1.	Gamapatias Monoclonais	79

Relatório de Estágio Curricular realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e Estudo de
Caso de um Doente com Mieloma Múltiplo

1.1. Mieloma Múltiplo	79
1.2. Caso clínico	83
7. Conclusão.....	87
Bibliografia	89
Anexos.....	103

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema ilustrativo da Citometria de Fluxo por Fluorescência associada ao Sysmex XN 9000

Figura 2- Representação do sinal elétrico produzido, proporcional ao volume da célula

Figura 3- Diagrama de Dispersão do canal WDF

Figura 4- Maturação de Eritrócitos

Figura 5- Maturação de Megacariócitos

Figura 6- Maturação de Neutrófilos

Figura 7- Maturação de Monócitos

Figura 8- Maturação de Eosinófilos

Figura 9- Basófilo

Figura 10- Maturação de Linfócitos

Figura 11- A cascata de coagulação sanguínea *in vivo* iniciada pelo fator tecidual (TF) na superfície celular

Figura 12- Nefelometria e turbidimetria

Figura 13- Principais proteínas constituintes das diferentes frações de um proteinograma obtido por eletroforese capilar

Figura 14- Proteinograma com o respetivo perfil eletroforético. Perfil eletroforético com presença de 1 pico na fração γ (proteína monoclonal), à esquerda. Perfil eletroforético com presença de 2 picos na fração β_2 e 1 pico na fração γ , à direita

Figura 15- Géis com imunofixação sérica. Imunofixação sérica com presença de componentes biclonais à esquerda (IgG κ e IgA κ). Imunofixação sérica com presença de componente monoclonal à direita (IgG λ)

Figura 16- Gel pentavalente. Suspeita de proteína monoclonal no 6' através da visualização de uma banda no gel. Componentes policlonais nas restantes pistas

Figura 17- Caracterização de proteinúrias. A- Esquema ilustrativo de proteinúria patológica, B- Vestígios de albumina, C- Proteinúria de origem tubular, D- Proteinúria de origem mista com grande quantidade de albumina e presença de $\beta 2$ microglobulina, E- Proteinúria de origem mista com pequena quantidade de albumina

Figura 18- Esquema ilustrativo da reação de imunodifusão radial, à esquerda. Placa de gel de imunodifusão usada no laboratório do SPC, à direita

Figura 19- Tiras de teste de *Immunoblotting* para pesquisa de Anticorpos Anti-Nucleares (ANA)

Figura 20- Imagens de IFI com os diferentes substratos utilizados no laboratório do SPC

Figura 21- Placas de cultura com crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (meio de GS) em A e *Klebsiella pneumoniae* (meio CLED) em B

Figura 22- Identificação microbiana através da tecnologia *MALDI-TOF*

Figura 23- Observação macroscópica de colónias de fungos

Figura 24- A – *Leishmania* (50x) ; B – *Trypanosoma cruzi* (100x); C – *Schistosoma haematobium* (40x); D – *Loa Loa* (50x); E – *Brugia malayi* (100x); F – *Wuchereria bancrofti* (100x)

Figura 25- A - *Plasmodium falciparum* (gametócito) (50x); B – *Plasmodium ovale* (50x)

Figura 26- Em cima, cromatograma de uma HA1c com presença de uma variante de hemoglobina, HbS, e respetivo perfil eletroforético, em baixo (Percentagem de HbS é de 36,5%)

Figura 27- Eletroforese de proteínas séricas do dia 28/01/2022

Figura 28- Imunofixação sérica do dia 28/01/2022

Figura 29- Imunofixação urinária do dia 05/05/2022

Figura 30- Número de análises realizadas no SPC nos setores de Hematologia (entre setembro e outubro), Imunologia (entre novembro e dezembro), Microbiologia (entre janeiro e fevereiro) e Bioquímica (entre março e abril)

Folha em branco

Lista de Tabelas

- Tabela 1– Identificação e respetiva composição dos principais tubos utilizados no CHUC na colheita de sangue (marca S-MONOVETTE®)
- Tabela 2- Equipamentos do Setor de Hemocitometria e princípios e tecnologias utilizados
- Tabela 3- Canais de Medição da Série-XN 9000
- Tabela 4- Equipamentos do Setor de Imunologia e metodologia associada
- Tabela 5- Padrões de ANCA
- Tabela 6- Equipamentos do Setor de Microbiologia e metodologia associada
- Tabela 7- Processamento de amostras de urina
- Tabela 8- Procedimento de identificação tendo em conta a interpretação semi-quantitativa das uroculturas
- Tabela 9- Procedimento laboratorial associado ao processamento de hemoculturas no BacT/ALERT® 3D
- Tabela 10- Procedimento aplicado após repicagem de frascos de hemocultura positivos
- Tabela 11- Procedimento laboratorial para LCR, Exsudados (vaginais p.ex.), Respiratórios (Expetoração, Aspirados e Lavados Brônquicos)
- Tabela 12- Técnicas manuais realizadas no subsetor de Serologia do SPC
- Tabela 13- Equipamentos do Setor de Bioquímica e metodologias associadas
- Tabela 14- Eletrólitos e iões - Analito e razão pela qual é medido
- Tabela 15- Pequenas moléculas e metabolitos - Analito e razão pela qual é medido
- Tabela 16- Proteínas - Analito e razão pela qual é medido
- Tabela 17- Lípidos e lipoproteínas - Analito e razão pela qual é medido

Tabela 18- Critérios de Diagnóstico de MM

Tabela 19- Descrição dos parâmetros do imunoensaio HLC

Tabela 20- Análises realizadas no dia da consulta de Hematologia/Oncologia do dia
28/01/2022

Tabela 21- Valores obtidos do proteinograma do dia 28/01/2022

Tabela 22- Ensaio *Hevylite* IgA realizado no dia 08/03/2022 e 05/05/2022

Folha em branco

Lista de Acrónimos

SPC	Serviço de Patologia Clínica
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
HUC	Hospital Universitário de Coimbra
HP	Hospital Pediátrico
HJ	Hospital Geral
INSPA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
BIM	<i>Bulk Input Module</i>
IOM	<i>Input Output Module</i>
UKNEQAS	<i>United Kingdom External Quality Assessment Service</i>
RIQAS	<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>
EQAS	<i>External Quality Assurance Services</i>
SLS	Lauril Sulfato de Sódio
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematócrito
VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
RDW	Coefficiente de Variação dos Eritrócitos
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Dispersão Frontal de Luz)
SSC	<i>Side Scatter</i> (Dispersão Lateral de Luz)
SFL	<i>Side Fluorescence</i> (Fluorescência Lateral)
NRBC	<i>Nucleated Red Blood Cell</i>
WNR	<i>White Cell Nucleated</i>
WDF	<i>White Cell Differential</i>
WPC	<i>White Cell Precursor</i>
PLT-F	<i>Fluorescent Platelet</i>
IPF	Fração Imatura de Plaquetas
BF	<i>Body Fluids</i>
ESP	Esfregaço de Sangue Periférico
VS	Velocidade de Sedimentação
AR	Artrite Reumatóide
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
TF	Fator Tecidual
PT	Tempo de Protrombina
aPTT	Tempo Parcial de Protrombina Ativada
FWW	Fator de von Willebrand
TEG	Tromboelastografia
ROTEM	Tromboelastometria
ITL	Inibidor do Tipo Lúpus
dRVVT	Veneno de Víbora de Russel Diluído
SCT	Tempo de Coagulação com Sílica
Ph	<i>Philadelphia</i>
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
SMDs	Síndromes Mielodisplásicas
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
FEIA	Imunoensaio Fluoroenzimático
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

LC-MSMS	Espectrometria de Massa em Tandem após separação por Cromatografia Líquida
IFI	Imunofluorescência Indireta
CLIA	Quimioluminescência
RIA	Radioimunoensaio
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina da Classe A
IgD	Imunoglobulina da Classe D
IgE	Imunoglobulina da Classe E
IgG	Imunoglobulina da Classe G
IgM	Imunoglobulina da Classe M
RBP	Proteína de Ligação Retinol
FR	Fator Reumatóide
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
EC	Eletroforese Capilar
FEO	Fluxo Eletro Osmótico
PM	Proteína Monoclonal
κl	Kappa Livre
λl	Lambda Livre
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
E1	Elastase 1 Pancreática
POD	Peroxidase
SLA/LP	Anticorpo Anti-Antigénio Hepático Solúvel e Pancreático
ASCA	Anticorpo Anti- <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
WR	<i>Waler-Rose</i>
EM	Esclerose Múltipla
IL-2	Interleucina-2
mTOR	<i>Mammalian Targets of Rapamycin</i>
MPO	Mieloperoxidase
PR3	Anticorpo Anti-Proteinase 3
CCP	Anticorpo Anti-Peptídeo Citrulinado Cíclico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
ULR	Unidade de Luz Relativa
DAIs	Doenças Autoimunes
ANA	Anticorpo Anti-Nucleares
MM	Mieloma Múltiplo
CLL	Cadeias Leves Livres
AAC	Autoanticorpos
ENA	Antigénios Nucleares Extraíveis
ELO	EUROLabOffice
ANCA	Anticorpo Anti-Citoplasma dos Neutrófilos
AMA	Anticorpo Anti-Mitocôndrias
ASMA	Anticorpo Anti-músculo liso
LC1	<i>Liver Cytosol Type 1</i>
LKM	Microssomas do Fígado e Rim
VSM	Células De Cultura De Aorta De Rato
MALDI-TOF	Dessorção Ionização Assistida por Matriz- Tempo de Voo
TSA	Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana
FISH	Hibridização por Fluorescência <i>in situ</i>
RT-PCR	<i>Real Time- Polymerase Chain Reaction</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ITU	Infeções do Trato Urinário
GS	Gelose de Sangue
CLED	Agar de Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

CGP	Coco Gram-Positivo
BGN	Bacilo Gram-Negativo
PVX	PolyViteX
SS	Ágar Salmonella Shigella
CNA	Colistina e Ácido Nalidíxico
CIN	Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CM	<i>Cooked Meat</i>
VCAT	Vancomicina, Colistina, Anfotericina, Trimetoprim
MS	Espectrometria de massa
CMI	Concentração Mínima Inibitória
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
BAAR	Bactérias Ácido-álcool-resistentes
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB	Tuberculose
NALC	N-acetil-L-cisteína
MGIT	<i>Middlebrook</i>
PANTA	Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico Trimetoprim, Azlocilina
SIRE	Streptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol
PZA	Pirazinamida
DGS	Direção Geral de Saúde
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
GGT	Gama-Glutamiltransferase
CK	Creatina Cinase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
BNP	Peptídeo Natriurético Do Tipo B
LDH	Lactato Desidrogenase
ADA	Adenosina-Desaminase
SACE	Enzima Conversora da Angiotensina Sérica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Troca Catiónica
MGUS	Gamapatia Monoclonal De Significado Indeterminado
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
CRAB	<i>Calcium Elevation, Renal Dysfunction, Anemia, Bone Disease</i>
CT	Tomografia Computorizada
PET-CT	Tomografia Por Emissão De Positrões Com Tomografia Computorizada
MRI	Imagem por Ressonância Magnética
HLC	<i>Heavy/Light Chain</i>

Folha em branco

Parte 1- Relatório de Estágio

1. Introdução

O presente relatório pretende descrever o estágio curricular desenvolvido no âmbito da unidade curricular “Tese/Estágio” do 2º ano do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade da Beira Interior. Assim, com este trabalho pretende-se consolidar o conhecimento teórico adquirido ao longo do meu período de formação académica e a aplicação prática do mesmo, numa abordagem laboratorial.

O estágio decorreu no Edifício de São Jerónimo, mais concretamente no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). O período de estágio foi de oito meses (setembro de 2021 a abril de 2022) igualmente distribuídos entre os quatro setores principais: Hematologia, Imunologia, Microbiologia e Bioquímica. Os objetivos propostos inicialmente são: aquisição de competências científicas e técnicas relativas à execução de técnicas analíticas utilizadas nas diferentes áreas do laboratório de patologia clínica do CHUC, formação em contexto de trabalho real e também a aplicação e integração dos conhecimentos adquiridos durante o ciclo de estudos.

Desde sempre a área da saúde me fascinou por diversos motivos e por estar em constante evolução, como bem sabemos pela pandemia com que fomos confrontados. As análises clínicas integram vários domínios científicos e têm o objetivo de auxiliar a previsão, diagnóstico e monitorização de doenças. As análises são essenciais nos cuidados de saúde e são tidas como uma peça fundamental na medicina, nomeadamente na patologia clínica.

A dissertação encontra-se dividida em duas partes, sendo que a primeira é relativa ao relatório de estágio e a segunda consiste na apresentação de um estudo de caso de um doente com uma gamapatia monoclonal, nomeadamente Mieloma Múltiplo. Inicialmente surgiu a ideia de complementar o relatório com uma pequena monografia e ao estagiar no setor de Imunologia esta patologia despertou-me interesse e curiosidade. Por essa razão elaborei um pequeno estudo e apresento o caso clínico de um doente, de forma a evidenciar a importância da harmonia e integração das principais valências de um laboratório de patologia clínica aquando do diagnóstico e monitorização de doenças.

2. Caracterização do Laboratório

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) diz respeito aos laboratórios das seguintes unidades hospitalares: Hospital Universitário de Coimbra (HUC), Hospital Pediátrico (HP) e Hospital Geral (HG). Os produtos biológicos circulam entre estas três instituições, para que se realizem as análises no laboratório mais especializado. O estágio decorreu apenas no laboratório principal, localizado no edifício de São Jerónimo do HUC.

O laboratório do SPC também recebe amostras da Maternidade Doutor Daniel de Matos, da Maternidade Bissaya Barreto e de outras unidades de saúde, isto porque o CHUC é tido como hospital de referência da zona centro. Contudo, quando se trata de análises que o SPC não realiza são enviadas as amostras para o exterior, podendo ser enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

O laboratório principal, situado no São Jerónimo, é constituído pela sala de colheitas, *corelab*, salas dos diferentes setores, respetivos gabinetes de validação e áreas administrativas. É setorizado nas 4 áreas principais: Imunologia, Hematologia, Microbiologia e Bioquímica. Os setores de Bioquímica e Hematologia funcionam essencialmente no *corelab*, mas também apresentam laboratórios individualizados. O *corelab* é um espaço composto por uma cadeia automatizada e vários aparelhos interligados, que possibilitam a integração direta das amostras na cadeia e respetiva distribuição pelos equipamentos tendo em conta os parâmetros a analisar. Este conceito de *corelab* constitui uma inovação a nível laboratorial, uma vez que reduz o tempo de resposta aos pedidos de análises e o número de amostras colhidas por doente, bem como otimiza recursos e simplifica processos e fluxos de trabalho. O *corelab* funciona 24h por dia, todos os dias, assegurando desta forma o serviço de urgência do CHUC.

As amostras biológicas que chegam ao balcão de triagem (situado no core) são integradas no sistema informático Clinidata XXI e posteriormente inseridas na cadeia automatizada ou entregues em mão. O sistema Clinidata XXI permite o rastreamento da amostra, visualizar o histórico e a informação clínica do paciente, elaborar listas de trabalho, visualizar os resultados e validar os mesmos e também adicionar análises e realizar tratamento estatístico. A informatização permite uma comunicação bidirecional entre os equipamentos e o sistema informático. Assim, a gestão laboratorial é mais rápida e eficiente, minimizando erros.

O Diretor do SPC é o Dr. Fernando Rodrigues e a equipa multidisciplinar que garante o bom funcionamento deste serviço é constituída por médicos especialistas em

Patologia Clínica, Farmacêuticos, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, Assistentes Técnicos e Assistentes Operacionais.

2.1. Fase Pré-Analítica

É necessário garantir a integridade e segurança da amostra até ao momento do seu processamento e para isso existe um conjunto de requisitos técnicos a ter em conta, tanto na sala de colheitas do hospital como nas enfermarias hospitalares. O Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) está organizado de maneira que a ordem de colheitas seja feita tendo por base um sistema de senhas, privilegiando primeiramente doentes em consulta de oncologia, transplantados e diabéticos. O utente é recebido na sala de colheitas e o técnico especialista em análises clínicas prepara o material necessário para efetuar a colheita. Este tem o dever de confirmar sempre a identidade do utente, através do nome completo, data de nascimento e número do processo. O técnico também questiona o utente acerca da preparação prévia requerida em algumas análises (jejum, dieta específica, entre outros). Nos casos em que o utente possua amostras colhidas pelo próprio, é importante perguntar e perceber se a colheita foi obtida de acordo com as informações indicadas pela ficha que o clínico forneceu, já que foi uma amostra colhida fora das instalações hospitalares. Uma vez verificado se o utente cumpriu todos os requisitos, o técnico procede então à identificação dos tubos ou porta-amostras, com as respetivas etiquetas com os respetivos códigos de barra, que conferem informação acerca do nome do doente, o tipo de tubo ou recipiente, bem como o setor no qual vai ser realizada a análise do material biológico.

A colheita deve ser efetuada cumprindo a legislação nacional e internacional específica. O tubo ou recipiente, que irá conter a amostra, deve ser adaptado à natureza da mesma e dos exames laboratoriais a efetuar. Como tal, existe no SPC uma ordem de colheita de tubos que é a seguinte: primeiramente deve ser colhida amostra para o tubo de hemocultura (tubos sem aditivos), seguido do tubo de soro com gel (tubo de bioquímica), tubo de coagulação e por último tubo de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). No momento da colheita há alguns aspetos críticos a ter em consideração tais como o posicionamento do utente, a brevidade da aplicação do garrote e o volume de sangue a colher. O garrote deve ser aplicado 4 dedos acima do local de punção para avaliar acessos, o tempo de garrotagem não deve exceder 1 minuto, pois uma garrotagem excessiva pode resultar em fluxo sanguíneo insuficiente para o braço, originando estase venosa (hemoconcentração). O volume de sangue a colher é outro

aspecto especialmente crítico aquando da colheita de amostras que têm de ser acondicionadas em tubo com anticoagulante, uma vez que a relação anticoagulante/amostra deve ser respeitada para que não haja nem diluição excessiva da amostra (caso o anticoagulante esteja em excesso), nem anticoagulante insuficiente que levaria à coagulação, embora que parcial, da amostra. Por outro lado, no caso das colheitas realizadas em enfermarias, como em ambiente de internamento hospitalar onde é comum que o doente tenha veias puncionadas para administração de soros ou fármacos. Deste modo, caso seja necessário realizar uma colheita de sangue para análise, a colheita deverá ser realizada no membro oposto, de modo a evitar hemodiluições, que falseiam, principalmente, as concentrações dos parâmetros bioquímicos, nomeadamente as concentrações de glicose, potássio, sódio, entre outros.

Tabela 1: Identificação e respetiva composição dos principais tubos utilizados no CHUC na colheita de sangue (marca S-MONOVETTE®)

		
Tubo de Hemograma; EDTA K ₃	Tubo de Soro com gel; Gel ativador de coagulação	Tubo de Coagulação; Citrato de Sódio 3,2%

Depois de realizada a colheita é importante a homogeneização dos tubos, principalmente os que contém anticoagulantes. No fim destes procedimentos, as amostras devem ser recolhidas e encaminhadas da sala de colheitas para o laboratório com a maior brevidade possível. As amostras com origem noutros locais, que não a sala de colheitas, exigem um correto transporte e manuseamento, para que se mantenha a integridade da amostra e, para a maioria das análises, este transporte não pode exceder 2 horas à temperatura ambiente. Deve-se evitar agitar a amostra durante o transporte, devido ao risco de hemólise associado, pelo que o tubo deve ser mantido em posição vertical e estável. É importante também evitar a exposição direta à luz pois influenciará parâmetros como o doseamento de bilirrubina (Stankovic et al., 2008).

É de notar que a maioria dos erros que ocorrem em laboratório dizem respeito a procedimentos relacionados com a fase pré-analítica, constituindo 46 a 68% dos erros que ocorrem, sendo esta a fase com mais etapas é necessária uma correta organização e um sentido de responsabilidade ainda maior para que estes erros possam ser evitados

(Donayre et al., 2013). Existem variáveis não controláveis e variáveis controláveis. Quanto às primeiras tem-se, por exemplo, a idade do doente, o sexo, grupo étnico e a gravidez. Podem existir vários interferentes nas amostras, tais como a hemólise (rompimento da parede da hemácia), a lipémia (presença de gordura na amostra), a presença de fibrina, diluições, quantidade insuficiente de amostra e se esta se encontra coagulada (Pedret et al., 2007).

2.2. Fase Analítica

Nesta fase, os assistentes técnicos no balcão de triagem situado no *corelab* verificam as amostras quanto à integridade das mesmas, conferindo os pedidos solicitados e identificam as amostras que entram na cadeia de automação e separam aquelas que serão diretamente distribuídas pelos respetivos setores. Assim, as amostras rececionadas podem ser totalmente processadas na cadeia, ser totalmente processadas fora da cadeia ou parcialmente processadas na cadeia com identificação, se necessário, para algum processamento adicional fora da cadeia.

Depois de efetuada a triagem, os tubos são colocados no *Bulk Input Module* (BIM) ou no *Input Output Module* (IOM), módulos de entrada das amostras, associados ao Accelerator a3600, equipamento este que vai conduzir e fazer a distribuição das amostras, de acordo com a leitura de código de barras, pelos diferentes autoanalisadores e módulos consoante os parâmetros em análise. Depois de realizada a análise, as amostras são encaminhadas pela cadeia até ao sistema de refrigeração onde ficam armazenadas.

2.3. Fase Pós-Analítica

A validação biopatológica compreende o controlo e a coerência do conjunto dos resultados das análises efetuadas, tendo por base os conceitos da validação analítica, o estado clínico do utente, toda a informação clínica fornecida pelo médico prescriptor, a terapêutica efetuada, os resultados anteriores e conhecimentos científicos e técnicos.¹

Assim, esta validação biopatológica só pode ser efetuada por especialistas que integram uma equipa de médicos Patologistas Clínicos, Técnicos Superiores de Saúde

¹ Despacho n.º 10009/2019 DR, N.º 212 5 de novembro de 2019 Pág. 66-80

ou Farmacêuticos, que têm a responsabilidade da integração e validação fisiopatológica dos resultados obtidos.

2.4. Controlo de Qualidade

A qualidade é um conceito definido por ser a aptidão de um produto ou serviço a fim de satisfazer as necessidades que o utilizador impõe. A garantia de qualidade laboratorial, que por sua vez é o conjunto das ações preestabelecidas e realizadas para se obter a garantia de que um produto ou serviço satisfaça certas necessidades, permite ter o domínio da organização de todas as tarefas que levam à qualidade. Inclui obrigatoriamente as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, abrangendo ainda os procedimentos de controlo, isto é, o controlo da qualidade interno e a avaliação externa da qualidade.¹

É essencial o controlo de qualidade num laboratório para que se possa avaliar o funcionamento dos métodos de trabalho, identificar possíveis lacunas e contribuir continuamente para uma melhoria dos procedimentos laboratoriais e garantir-se um correto exercício profissional. A qualidade deve ser uma preocupação constante de todos os colaboradores do laboratório.

A avaliação externa da qualidade corresponde à avaliação, por um organismo exterior, da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório.¹ Na prática, diz respeito a um conjunto de amostras que são enviadas ao laboratório para serem feitos os exames laboratoriais exatamente pelos mesmos procedimentos que as análises das amostras efetuadas na rotina habitual do laboratório. São obtidos resultados que são então comparados com os resultados que são previstos pelas entidades responsáveis pelo controlo de qualidade. A avaliação é feita de forma regular, através da participação nestes programas de qualidade interlaboratorial e que, através da análise estatística dos dados recebidos dos diferentes participantes (laboratórios) é demonstrado o desempenho de cada laboratório, traduzindo-se na monitorização da qualidade das análises em benefício dos doentes. Todos os setores do SPC são submetidos a programas de controlo externo de qualidade tais como: *United Kingdom External Quality Assessment Service* (UKNEQAS), *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS) e *External Quality Assurance Services* (EQAS).

Quanto ao controlo interno da qualidade este é o conjunto de procedimentos realizados num laboratório com o objetivo de permitir um controlo da qualidade dos resultados dos exames laboratoriais ao longo de todo o processo analítico. ¹ Na fase analítica, este controlo, feito diariamente no SPC, é responsável pela avaliação da

precisão do método nos equipamentos. São utilizadas amostras controlo, com diferentes níveis de concentração do analito que se pretende controlar, representando a concentração do analito em condições fisiológicas e em condições patológicas. Assim que se obtêm os resultados são construídas cartas de controlo (gráfico de Levey-Jennings) onde é avaliada a imprecisão do teste, de acordo com as regras de Westgard (Pang, 2015). Caso o resultado obtido não esteja dentro do intervalo de confiança esperado, é indicativo de erro e é imperativo corrigir. As medidas corretivas passam pela implementação de ações como uma nova calibração, manutenção, alteração do reagente ou consumíveis, ou alteração do próprio controlo, pois este sofre alterações ao longo do tempo (quando aberto).


3. Setor de Hematologia

A hematologia diz respeito ao estudo do sangue, quer em condições saudáveis, quer patológicas (Ciesla, 2007). O estudo do sangue compreende o estudo do plasma e das células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Para prever, detetar e diagnosticar diferentes doenças hematológicas é importante a determinação do número de populações celulares sanguíneas e também é fundamental a avaliação da sua morfologia (Keohane, 2020). Por estas razões, este ramo da ciência torna-se tão fascinante e desafiante.

O setor de Hematologia está subdividido em várias áreas analíticas consoante a especificidade das análises: hemocitometria, hemostase, citologia, cariótipo, imunofenotipagem, biologia molecular e citogenética.

Na Tabela 2 encontram-se referidos os equipamentos existentes no setor.

Tabela 2: Equipamentos do Setor de Hemocitometria e princípios e tecnologias utilizados

EQUIPAMENTO	PRÍNCIPIOS E TECNOLOGIAS
<p>Cadeia de automação Sysmex XN-9000, Sysmex Corporation:</p> 	<p>Impedância elétrica com focagem hidrodinâmica; Citometria de fluxo com fluorescência; Método laurilsulfato de sódio (SLS) sem cianeto</p>

XN-10 (3xs)		
XN-20		
SP-50		Técnica de May-Grunwald Giemsa (Aparelho de realização e coloração de esfregaços de sangue periférico)
DI-60		Sistema automatizado de análise digital de imagem com capacidade de localização e pré-classificação das células
VES-MATIC CUBE 30		Técnica de Westergren modificada
HemoCELL; ACL TOP 750 Las		Espectrofotometria, turbidimetria, imunoensaio turbidimétrico
Megafuge™ 40 Centrifuge Series (Thermo Scientific™)		Centrifugação SMARTSpin™
ROTEM sigma (Werfen)		Tromboelastometria

3.1. Hemograma

Devido à grande diversidade de informações que o hemograma pode fornecer, mesmo que em geral bastante inespecíficas, este exame é um dos mais solicitados na prática clínica (Keohane, 2020).

O sangue periférico de indivíduos saudáveis é constituído por células totalmente diferenciadas que são laboratorialmente contadas e avaliadas.

No passado, as contagens de glóbulos e as várias determinações do hemograma eram feitas por técnicas manuais, demoradas e trabalhosas, sendo a dosagem de hemoglobina (Hb), o hematócrito (Hct) e a contagem de leucócitos (L) as determinações mais usadas. Atualmente, essas e outras determinações são realizadas em minutos, em instrumentos automatizados ou semi automatizados (Bain, 2016b). Esta evolução tecnológica veio introduzir inovações que mudaram a rotina dos

laboratórios, tornando-os mais eficientes e ágeis, além de apresentarem uma melhor precisão e exatidão nos resultados.

O hemograma completo é uma análise de rotina e compreende o eritrograma, que transmite dados sobre a avaliação dos eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), o plaquetograma (plaquetas) e o leucograma, que avalia os leucócitos (glóbulos brancos) (Keohane, 2020). Assim, o objetivo do hemograma é identificar, qualitativa e quantitativamente, as diversas populações de células que circulam no sangue periférico. Para tal, são utilizadas amostras de sangue total colhidas em tubos com anticoagulante, EDTA K3, composto que permite manter a integridade das células, impedindo a formação do coágulo sanguíneo.

3.1.1. Eritrograma

O eritrograma traduz as alterações nos eritrócitos, através da contagem de eritrócitos; Dosagem de Hemoglobina (Hb); Hematócrito (Hct) (percentagem de eritrócitos no volume total de sangue); Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração De Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM); e Coeficiente de Variação dos Eritrócitos (RDW), que são os chamados índices hematimétricos (Keohane, 2020).

A principal função dos eritrócitos é transportar O₂ dos alvéolos pulmonares para os tecidos e remover destes o CO₂, levando-o no sentido inverso para ser eliminado nos pulmões. Associado à contagem numérica dos eritrócitos (10⁶/μL) está patente no eritrograma informação sobre o conteúdo em hemoglobina (g/dL), proteína constituída por quatro grupos heme ligados a quatro cadeias globínicas, capazes de transportar quatro moléculas de oxigénio. A hemoglobina é, portanto, essencial ao cumprimento da principal função do eritrócito (Hoffbrand et al., 2016; Keohane, 2020).

É de notar a relevância clínica dos índices eritrocitários e dos reticulócitos pois auxiliam na diferenciação das causas de anemia. A anemia, alteração sanguínea caracterizada pela diminuição de eritrócitos em circulação, causa a diminuição da capacidade de transporte do oxigénio. Assim sendo, a avaliação direta da quantidade de hemoglobina, pelo doseamento de Hgb, fornece a informação mais fidedigna para a determinação de presença de anemia no paciente (Keohane, 2020).

O termo Hct diz respeito à fração ocupada pelos eritrócitos no sangue centrifugado; uma pequena parte desse volume corresponde a plasma retido entre as células, sendo o Hct expresso em percentagem (Bain, 2016b). Quando o doente possui anemia, o Hct encontra-se diminuído por causa da falta de eritrócitos (Keohane, 2020).

O VCM avalia o tamanho dos eritrócitos. Um VCM elevado indica hemácias macrocíticas, ou seja, hemácias grandes. Um VCM reduzido indica hemácias microcíticas (Keohane, 2020). Este indicador ajuda igualmente a diferenciar os vários tipos de anemia (Hoffbrand et al., 2016b).

O nível de HCM é o peso da hemoglobina dentro das hemácias e a CHCM avalia a concentração da hemoglobina dentro do eritrócito. Quando as hemácias têm hemoglobina em quantidades inferiores ao normal, elas são ditas ‘hipocrómicas’ (Keohane, 2020).

3.1.2. Leucograma

O leucograma é um exame integrado no hemograma que se dedica à contagem total e diferencial de leucócitos. Estes integram uma população de células hematológicas que se pode dividir em dois grandes grupos: polimorfonucleares e os mononucleares. A função dos leucócitos é conferir proteção ao hospedeiro contra infeções e danos celulares, nomeadamente na fagocitose, participam em reações alérgicas, reconhecimento de antigénios estranhos e produção de anticorpos (Turgeon Louise, 2014a). Assim, quando há alterações de valores de leucócitos no sangue periférico, estas podem estar relacionadas com eventos patológicos, como infeções, respostas imunológicas, carcinomas, mas também associados a fatores fisiológicos.

A contagem diferencial de cada leucócito é emitida em % (valor relativo) e em $10^3/\mu\text{L}$ (valor absoluto). A avaliação quantitativa, que inclui a contagem total e diferencial, é baseada em valores padrão estabelecidos por faixas etárias (Clark et al., 2020).

A primeira análise do leucograma diz respeito à verificação da contagem total dos leucócitos: quando estes estão acima do valor de referência denomina-se por leucocitose, e quando se encontram abaixo designa-se leucopenia (Keohane, 2020).

3.1.3. Plaquetograma

As plaquetas são produzidas na medula óssea pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. A trombopoietina é a maior reguladora da produção de plaquetas e 95% da produção ocorre no fígado. O valor normal para a contagem de plaquetas varia de 150 a $450 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Hoffbrand et al., 2016c; Bain, 2016b).

A função principal das plaquetas é participarem na formação de tampões mecânicos durante a resposta hemostática à lesão vascular (Hoffbrand et al., 2016c).

Isto é, as plaquetas são responsáveis por manter a integridade do compartimento vascular aquando da lesão, pois ao aderirem à superfície de vasos sanguíneos danificados formam agregados plaquetares e favorecem mecanismos relacionados com a formação do coágulo.

Associada a alterações na contagem das plaquetas tem-se a trombocitose, que consiste num aumento deste parâmetro, tendo em conta valores de referência para um indivíduo saudável. A trombocitose resulta, maioritariamente, da produção medular aumentada de plaquetas. Por outro lado, temos a trombocitopenia que é a diminuição da contagem das plaquetas, ficando abaixo do valor de referência para um indivíduo saudável (Bain, 2016a).

Os parâmetros avaliados no plaquetograma são: o número total de plaquetas; o volume plaquetar médio, que indica o volume médio ocupado por cada plaqueta (fL); volume ocupado pelas plaquetas no volume de sangue total, em percentagem, ou plaquetócrito, e por último, o coeficiente de variação de plaquetas (fL) (Bain, 2016c).

3.2. Metodologias associadas ao hemograma

No SPC, nomeadamente no Setor de Hematologia, existem analisadores hematológicos da série XN da Sysmex. Mais especificamente, a cadeia XN-9000 contempla três contadores XN-10, um contador XN-20, um módulo SP-10 e um módulo de análise digital da morfologia celular DI-60. Esta solução de automatização foi projetada e otimizada para responder a fluxos de trabalho maiores e mais complexos, como se verifica no laboratório do SPC.

Estes analisadores hematológicos assentam em várias metodologias: Citometria de Fluxo Fluorescente (Diferencial leucocitária e IG, NRBC, RET, IRF, PLT-F, IPF); Impedância com Focagem Hidrodinâmica (PLT-I, RBC, HCT) e Método de Sulfatolauril de Sódio, livre de cianeto (Hb) (Sysmex, 2021b).

Com estes analisadores o número de resultados reportáveis aumenta pelo facto de possuírem um sistema de alarmes mais otimizado, com vista à deteção de anomalias celulares. Podem ser analisados também líquidos biológicos, como líquidos serosos, sinovial e líquido cefalorraquidiano (Sysmex, 2021c).

Citometria de Fluxo por Fluorescência

A Citometria de Fluxo por Fluorescência é usada para avaliar características fisiológicas e químicas das células e de outras partículas biológicas. Esta metodologia

dá-nos informação sobre o tamanho, a estrutura e o interior da célula. Tanto as células como as outras partículas são examinadas enquanto fluem através de uma célula de fluxo muito estreita. Primeiramente, a amostra de sangue é aspirada, de seguida, diluída de acordo com um fator pré-determinado, sendo depois marcada com um marcador fluorescente que se liga especificamente aos ácidos nucleicos. A amostra é seguidamente transportada para a célula de fluxo e vai ser iluminada por um laser semiconductor, que consegue separar as células utilizando três sinais: dispersão frontal de luz (*forward scatter* ou FSC); dispersão lateral de luz (*side scatter* ou SSC) e fluorescência lateral (*side fluorescence* ou SFL) (Figura 1). A intensidade da dispersão frontal indica o volume celular. A dispersão lateral fornece informação sobre o conteúdo celular, como por exemplo, núcleos e grânulos. A fluorescência lateral indica a quantidade de DNA e RNA presente na célula. De notar que as células com propriedades físico-químicas semelhantes vão constituir um grupo num gráfico que é designado de diagrama de dispersão. Utiliza-se a citometria de fluxo com fluorescência para as contagens de células sanguíneas, por exemplo, no caso da contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de eritroblastos nucleados e reticulócitos (Sysmex, 2021c).

A contagem diferencial engloba as cinco diferentes populações de leucócitos e os granulócitos imaturos, sendo expressa em percentagem e número absoluto.

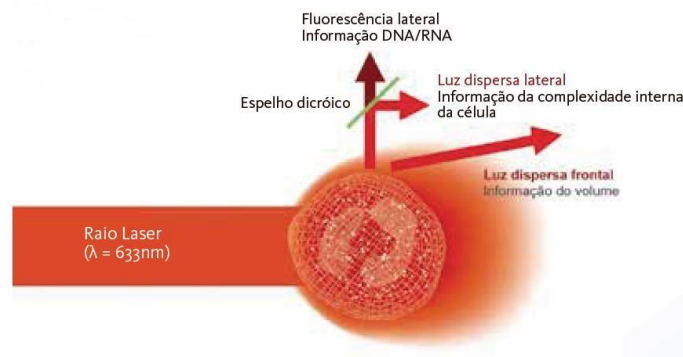


Figura 1: Esquema ilustrativo da Citometria de Fluxo por Fluorescência associada ao Sysmex XN 9000. Adaptado de (Stopper, 2012)

Impedância Elétrica

A contagem dos eritrócitos e plaquetas utiliza o princípio da impedância elétrica, desenvolvido inicialmente por Coulter, que tem por base a deteção e medição de alterações da corrente elétrica provocada pela resistência elétrica conferida pela passagem das células numa pequena abertura entre eletrodos, ou seja, há um aumento da resistência quando uma célula sanguínea com baixa condutividade passa por um campo elétrico. Essa alteração na voltagem origina um pulso elétrico proporcional ao tamanho da célula (Figura 2). O número de pulsos corresponde à contagem das células

e a amplitude do pulso ao volume da célula, traduzindo-se num histograma de distribuição de volume.

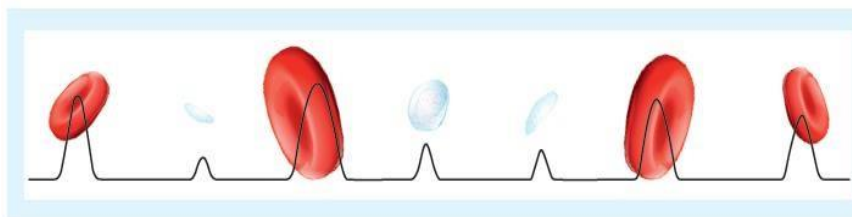


Figura 2: Representação do sinal elétrico produzido, proporcional ao volume da célula. Adaptado de (Sysmex, 2016)

Método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS)

A hemoglobina é um parâmetro de diagnóstico de rotina em cada hemograma. O método de deteção SLS de hemoglobina, nos contadores da Sysmex, utiliza laurilsulfato de sódio (SLS) sem cianeto (Schapkaitz et al., 2018). O reagente usado hemolisa os eritrócitos e leucócitos da amostra e a reação química tem início com a alteração da globina, oxidando o grupo heme e dá origem a um complexo corado (SLS-HGB), cuja absorvância pode ser medida a 555 nm. Posteriormente é convertida em concentração (g/dL) (Burns, 2015). Os métodos baseados neste princípio são normalmente influenciados pela turbidez da amostra propriamente dita. Em amostras de sangue, a turbidez pode dever-se a lipémia ou a leucocitose. Ao usar-se o método SLS estas interferências podem ser minimizadas devido ao efeito do reagente (Sysmex, 2021c).

3.2.1. Canais de Medição da Série XN

Como já dito anteriormente, o SPC tem analisadores hematológicos da série XN da Sysmex. Os eritroblastos (NRBC-*nucleated red blood cell*), apresentam uma dimensão e um núcleo semelhante aos linfócitos e, por isso, muitos analisadores hematológicos classificam erradamente os NRBC e apresentam uma contagem total de leucócitos e de linfócitos erradas. É necessário, portanto, existir uma exatidão nestas contagens por dois motivos principais: em amostras de sangue de recém-nascidos e outras amostras com uma contagem de NRBC elevada, a contagem de leucócitos tem de ser corrigida. Em amostras de sangue de adultos, mesmo uma contagem muito baixa de NRBC pode ter significado clínico. É uma vantagem usar-se estes analisadores da Sysmex pois fornecem uma contagem de NRBC sofisticada e exata quer em contagens

elevadas, quer baixas. Os NRBC são expressos em % (por 100 leucócitos) e # (por μl) (Sysmex, 2021a).

Estes analisadores caracterizam-se por ter novos canais de medição como o WNR (*white cell nucleated*), WDF (*white cell differential*), WPC (*white cell precursor*) e o PLT-F (*fluorescent platelet*) (Sysmex, 2021c).

No canal WNR há contagem total de leucócitos, havendo distinção e posterior determinação do número de basófilos e eritroblastos (Burns, 2015). O analisador mede a fluorescência lateral e a dispersão frontal de luz. A fluorescência lateral avalia o conteúdo de material nucleico para identificação e quantificação de eritroblastos e leucócitos. A luz desviada frontalmente mede o tamanho da célula (Stopper, 2012).

No canal WDF há uma análise da “diferencial de 6 - partes” que tem por base uma nova metodologia de discriminação entre monócitos, linfócitos, linfócitos atípicos e blastos (Stopper, 2012). Ambos os canais (WNR e WDF) utilizam a citometria de fluxo com fluorescência.

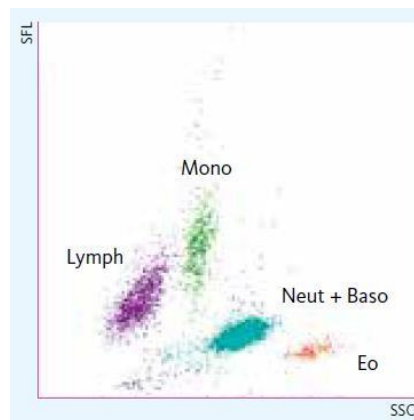


Figura 3: Diagrama de Dispersão do canal WDF. Adaptado de (Enhancement, 2016)


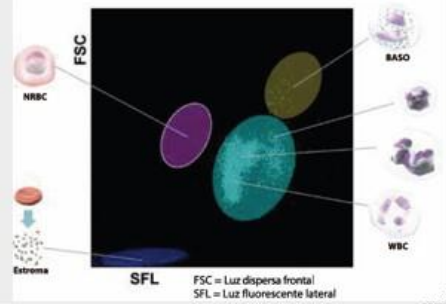

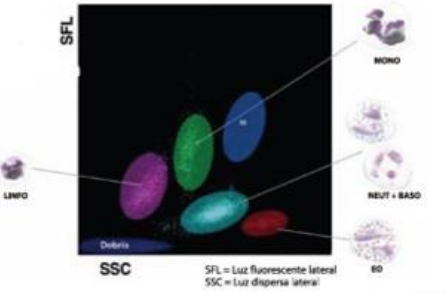

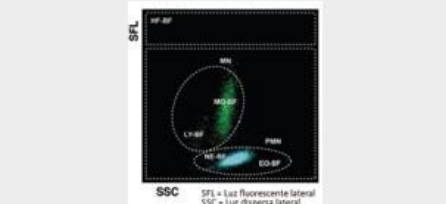

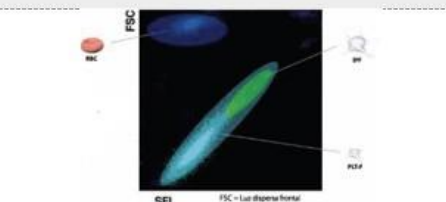

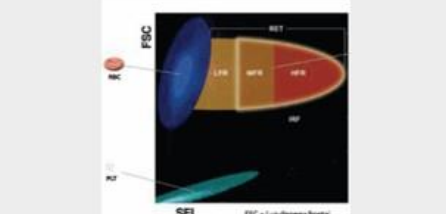
O novo canal de precursores de leucócitos (WPC), presente no analisador XN-20, dos únicos existentes no país, separa o alerta de “blastos/ linfócitos anormais” que é gerado pelo canal WDF. Este canal diferencia, assim, este alerta tendo em conta processos reativos e de suspeita maligna, podendo até remover o aviso (Noordegraaf et al., 2016).

Revela-se importante um segundo método de análise de plaquetas realizado no canal PLT-F porque é melhorada a análise de plaquetas em amostras patológicas utilizando um corante fluorescente específico, a oxazina que cora as superfícies dos retículos endoplasmáticos rugosos e das mitocôndrias. Adicionalmente, também fornece o parâmetro “Fração Imatura de Plaquetas (IPF)” para avaliação e diferenciação da trombocitopenia (Stopper, 2012). O parâmetro IPF avalia diretamente a trombopoiese (processo de formação de plaquetas) e é utilizado em conjunto com

outras informações clínicas disponíveis para diferenciação dos mecanismos fisiopatológicos das causas de trombocitopenia (Stopper, 2012).

O RDW é o índice que revela anisocitose, ou seja, presença de hemácias de tamanhos variados na amostra examinada. Este índice será considerado alterado quando o percentual for maior do que 15%. Neste caso, significa que existem muitas hemácias de tamanhos diferentes. Isso pode indicar hemácias com problemas de morfologia (Bain, 2016c).

Tabela 3: Canais de Medição da Série-XN 9000. Adaptado de (Stopper, 2012; Sysmex, 2012)

Canal de Medição	Características	Tecnologia	Parâmetros Reportáveis	Gráfico de Dispersão
 <p>XN - CBC NRBC</p>	<p>WNR (White nucleated cell)</p> <p>Avaliação e quantificação dos eritroblastos (NRBC) automática para todos os hemogramas; NRBC quantificado em todos os hemogramas; Correção automática da contagem de leucócitos e linfócitos; Minimiza a interferência de eritrócitos resistentes à lise e de lípidos</p>	<p>Citometria de fluxo fluorescente com corante de polimetina específico para ácidos nucleicos e lise celular específica</p>	<p>WBC, BASO#, BASO%, NRBC#, NRBC%</p>	 <p>FSC = Luz dispersa frontal SFL = Luz fluorescente lateral</p>
 <p>XN - DIFF IG</p>	<p>WDF (White Cell Differential)</p> <p>Análise de granulócitos imaturos (IG) em todas as diferenciais leucocitárias; Verdadeira diferencial de 6 partes - Granulócitos imaturos completamente diferenciados para validação automática; Metodologia de discriminação entre monócitos, linfócitos, linfócitos atípicos e blastos</p>	<p>Citometria de fluxo fluorescente e a metodologia SAFLAS</p>	<p>NEUT%, NEUT#, LINFO%, LINFO#, MONO%, MONO#, EO%, EO#, IG%, IG#</p>	 <p>SFL = Luz fluorescente lateral SSC = Luz dispersa lateral</p>
 <p>XN - BF DIFF</p>	<p>BF (Body fluids)</p> <p>Canal dedicado para análise de líquidos biológicos com diferencial de 2-partes</p>	<p>Citometria de fluxo fluorescente</p>	<p>WBC-BF, TC-BF, RBC-BF*, PMN%, PMN#, MN%, MN#</p>	 <p>SFL = Luz fluorescente lateral SSC = Luz dispersa lateral</p>
 <p>PLT-F IPF</p>	<p>PLT-F (Contagem de Plaquetas e IPF)</p> <p>Método com corante fluorescente plaqueta-específico (Oxazina); Canal de medição que utiliza fluorescência e que aumenta a quantidade de células contadas até 6 vezes</p>	<p>Citometria de fluxo fluorescente com corante específico para plaquetas</p>	<p>PLT-F - Plaqueta Fluorescente IPF - Fração Imatura de Plaquetas</p>	 <p>FSC = Luz dispersa frontal SFL = Luz fluorescente lateral</p>
 <p>RET RET-He</p>	<p>RET (RET, IRF, RET-He)</p> <p>Método rápido e automático; Informação com relevância clínica para avaliação de quadros de anemia quando analisada em conjunto com outras informações clínicas disponíveis; Monitoramento celular da eritropoiese (IRF - avalia a produção de reticulócitos; RET-He - avalia a incorporação de ferro na produção da hemoglobina)</p>	<p>Luz dispersa frontal e fluorescência lateral</p>	<p>RET#, RET%, IRF (Fração Imatura dos Reticulócitos) e RET-He (Conteúdo de Hemoglobina nos Reticulócitos)</p>	 <p>FSC = Luz dispersa frontal SFL = Luz fluorescente lateral</p>

3.3. Esfregaço de Sangue Periférico

O Esfregaço de Sangue Periférico (ESP) consiste numa técnica de avaliação hematológica que permite avaliar a morfologia dos leucócitos, eritrócitos, plaquetas e fazer uma contagem diferencial de leucócitos (Landis-Piwowar et al., 2015).

É da responsabilidade de um determinado laboratório, ao avaliar um hemograma, determinar as situações em que se pondera a necessidade de realizar e visualizar um ESP, juntamente com o histórico clínico do doente. Torna-se inconcebível proceder à avaliação microscópica de todas as amostras num laboratório com a dimensão do existente no SPC. Mas, em geral, um ESP é preparado para observação microscópica quando os valores do hemograma obtidos no aparelho automatizado diferem daquilo que é considerado normal. Um ESP não automatizado é feito colocando uma pequena gota de sangue numa das extremidades de uma lâmina de microscópio e espalha-se essa gota para criar uma “película” de sangue. Após a secagem, a lâmina é corada com uma coloração do tipo Romanowsky (Landis-Piwowar et al., 2015). Esta técnica é efetuada de forma totalmente automatizada no Sysmex SP-10, que realiza o esfregaço e a coloração de May-Grünwald Giemsa, sendo a lâmina depois digitalizada com recurso ao DI-60. Este último envia diretamente essa digitalização para o software Cella Vision. A observação e avaliação do esfregaço sanguíneo é efetuada por um médico patologista que pode mudar a caracterização das células que o DI-60 sugere e introduzir comentários, caso necessário.



Figura 4: Maturação de Eritrócitos. Adaptado de (Rodak et al., 2017c)



Figura 5: Maturação de Megacariócitos. Adaptado de (Rodak et al., 2017e)

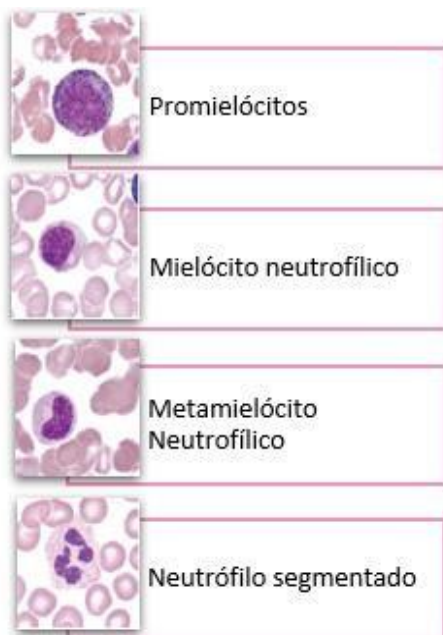


Figura 6: Maturação de Neutrófilos. Adaptado de (Rodak et al., 2017g)



Figura 7: Maturação de Monócitos. Adaptado de (Rodak et al., 2017f)



Figura 8: Maturação de Eosinófilos. Adaptado de (Rodak et al., 2017b)



Figura 9: Basófilo. Adaptado de (Rodak et al., 2017a)



Figura 10: Maturação de Linfócitos. Adaptado de (Rodak et al., 2017d)

3.4. Velocidade de Sedimentação

A Velocidade de Sedimentação (VS) é um teste laboratorial, simples e de baixo custo utilizado no diagnóstico de uma ampla variedade de situações clínicas.

Este teste caracteriza um parâmetro bioquímico que traduz o processo de sedimentação de uma coluna vertical de eritrócitos ao fim de 60 minutos, na ausência de vibração e à temperatura ambiente, sendo que o seu resultado depende não só de fatores eritrocitários, como também de fatores plasmáticos (Olshaker et al., 1997). No SPC este parâmetro é feito com recurso ao equipamento Vesmatic Cube 30.

Atualmente, mesmo com a variedade de exames complementares mais sofisticados, a VS continua a ser requisitada com muita frequência pelos reumatologistas, que o utilizam no diagnóstico e no acompanhamento clínico de doenças como a artrite reumatóide (AR) e o lúpus eritematoso sistémico (LES) (Saboor-Yaraghi, 2000). Apesar de ainda ser utilizada na rotina laboratorial, este exame revela-se impreciso devido à baixa sensibilidade e especificidade no processo inflamatório, infeccioso ou neoplásico (Olshaker et al., 1997). Por esta razão, nenhuma patologia em específico pode ser excluída ou diagnosticada meramente pela medição da VS (Saboor-Yaraghi, 2000).

3.5. Hemostase

Para a sobrevivência humana é estritamente necessário um rápido e eficiente mecanismo para parar um sangramento nos locais de lesão de vasos sanguíneos. No entanto, tem de haver uma resposta controlada para evitar o desenvolvimento de coágulos extensos e para destruir esses coágulos, assim que o dano seja reparado. O mecanismo hemostático é caracterizado também por manter o sangue num estado fluído enquanto circula dentro do sistema vascular. Este sistema representa um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes aliados a um processo de fibrinólise. Ou seja, é crucial este equilíbrio entre dois fenómenos antagónicos: hemorrágicos e trombóticos. Estão envolvidas plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação, processo de fibrinólise e vasos sanguíneos. A fibrinólise é uma resposta hemostática normal ao dano vascular (Hoffbrand et al., 2016c; Laffan et al., 2017).

A cascata de coagulação sanguínea *in vivo* envolve um sistema biológico de amplificação onde há relativamente poucas substâncias iniciadoras que ativam, sequencialmente, por proteólise, uma cascata de proteínas precursoras circulantes que culmina na geração de trombina. Esta, por sua vez, converte fibrinogénio plasmático solúvel em fibrina (Figura 11). A fibrina é um composto altamente ativador e agregador plaquetar, por isso envolve os agregados plaquetários nos locais da lesão vascular e converte os tampões plaquetários primários instáveis em tampões hemostáticos firmes, definitivos e estáveis (Hoffbrand et al., 2016c).

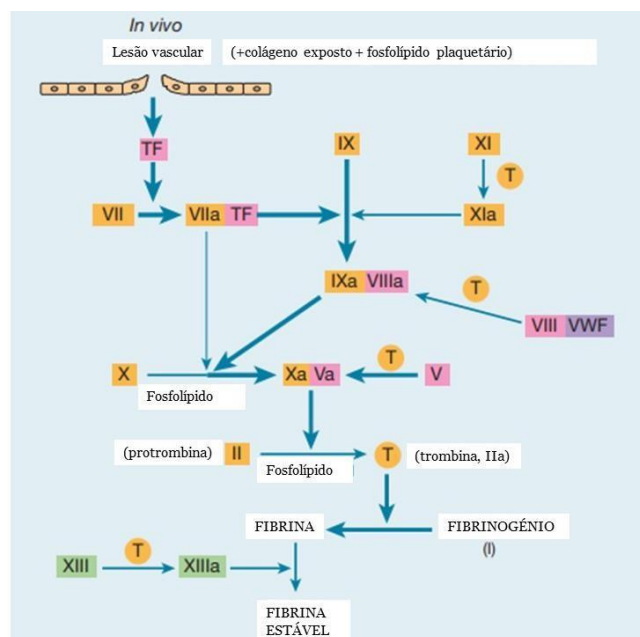


Figura 11: A cascata de coagulação sanguínea *in vivo* iniciada pelo fator tecidual (TF) na superfície celular. Adaptado de (Hoffbrand et al., 2016c).

Por fim, são ativados mecanismos com vista a assegurar que a formação do coágulo é limitada e reparam o endotélio destruído, através de processos fibrinolíticos associados à destruição desse mesmo coágulo (Laffan et al., 2017).

3.6. Metodologias associadas à hemostase

São vários os métodos através dos quais se executam os testes associados aos fenómenos da coagulação. O SPC possui o autoanalisador ACL TOP 750, equipamento totalmente automatizado, com o propósito de analisar múltiplos parâmetros, tendo por base três metodologias principais: o método coagulimétrico, o método cromogénico e o método imunológico, descritos a seguir (Milos et al., 2009).

O princípio do método coagulimétrico baseia-se na medição do tempo de coagulação, isto é, o tempo necessário para detetar a formação de fibrina, determinado pela turbidez da amostra a 671 nm. A radiação dispersa é convertida em sinais elétricos, que se traduzem no tempo de coagulação (Milos et al., 2009). A maioria dos parâmetros associados à coagulação são determinados mediante esta metodologia.

A base da metodologia associada às reações cromogénicas assenta no princípio de deteção do analito de interesse pela sua reação com um substrato cromogénico. O produto resultante desta reação é um composto corado (cromóforo) e é detetado por espectrofotometria a 405 nm (Milos et al., 2009). No SPC são avaliados o fator Xa, a proteína C, a antitrombina e o plasminogénio, com esta metodologia.

O método imunológico é um imunoensaio turbidimétrico que é utilizado no laboratório do SPC para pesquisar D-Dímeros. Este método traduz a concentração do analito (e não a sua atividade) medindo a mudança na sua densidade ótica. O princípio em que este método se baseia é o da reação do antigénio presente no plasma do doente com o anticorpo (unido a partículas de látex) específico do analito em estudo. Na presença do analito, há aglutinação das partículas de látex, traduzindo-se na diminuição da radiação transmitida (Hiraoka et al., 2019). A diminuição da turbidez, ou seja, da radiação que alcança o detetor, é registada pelo instrumento e o resultado é obtido pela diferença da turvação final e inicial. Os testes imunológicos realizados no ACL TOP usam canais de 405 nm ou 671 nm e ambos são caracterizados por medirem a absorvância que passa pela cuvete. A radiação é absorvida pelo fluido na cuvete, sendo diretamente proporcional à concentração de complexos antigénio-anticorpo (Milos et al., 2009).

3.6.1. Testes de *Screening* de Coagulação

A requisição de provas de *screening* da coagulação está relacionada com o facto de ser comum dividir as doenças relacionadas com a hemostase em patologias associadas a eventos hemorrágicos ou a eventos trombóticos. Isto porque uma hemostase defeituosa com sangramento anormal pode resultar de: doença vascular, trombocitopenia (ou outro problema de função plaquetária) ou, por último, um defeito na coagulação sanguínea (Hoffbrand et al., 2016c).

Os testes de *screening* fornecem uma avaliação dos sistemas extrínsecos e intrínsecos da coagulação sanguínea e também da conversão do fibrinogénio em fibrina. O tempo de protrombina (PT) mede os fatores VII, X, V, protrombina e fibrinogénio (Hoffbrand et al., 2016c).

O tempo parcial da protrombina ativada (aPTT) mede os fatores VIII, IX, XI e XII e adicionalmente os fatores X, V, protrombina e fibrinogénio (Hoffbrand et al., 2016c).

A maioria dos ensaios são baseados no aPTT ou no PT onde todos os fatores, exceto aquele que se está a avaliar, estão presentes no substrato de plasma. Estão disponíveis variados métodos químicos, cromogénicos e imunológicos para quantificar outras proteínas tais como fibrinogénio, Fator de von Willebrand (FVW) e fator VIII (Hoffbrand et al., 2016c).

A agregometria plaquetária convencional mede o decréscimo na absorvância da luz no plasma rico em plaquetas como um agregado plaquetário. Um estado hiperfibrinolítico clinicamente significativo, por exemplo, durante um transplante de fígado, pode ser detetado por medição viscoelástica da estabilidade do coágulo usando tromboelastografia (TEG) ou tromboelastometria (ROTEM) (Hoffbrand et al., 2016c).

O inibidor do tipo lúpus (ITL), ou também conhecido por anticoagulante lúpico, é considerado um inibidor adquirido da coagulação, pois prolonga *in vitro* os tempos de coagulação dependentes de fosfolípidos, por neutralização dos fosfolípidos dos reagentes utilizados em hemostase. Antagonicamente, *in vivo*, a sua presença está associada a quadros clínicos de trombozes venosas e/ou arteriais, com necessidade de tratamento com um anticoagulante específico (Marlar et al., 2008).

O conjunto de testes realizados para identificar ITL, no SPC, inclui o aPTT, Tempo de coagulação com Veneno de víbora de Russell Diluído (dRVVT), e o Tempo de Coagulação com Sílica (SCT) (Marlar et al., 2008). Tendo em conta as orientações para a deteção do ITL, recomenda-se que seja colhido sangue venoso para um tubo com citrato de sódio na proporção 1:9, tubo esse sujeito a dupla centrifugação. Adicionalmente, devem ser realizadas duas provas (dRVVT e SCT) baseadas em

diferentes metodologias. Cada prova deve contemplar um teste de *screening*, com baixa concentração de fosfolípidos (dRVVT_{screen} e SCT_{screen}) e um teste confirmatório com maiores concentrações de fosfolípidos (dRVVT_{confirm} e SCT_{confirm}) (Devreese et al., 2020; Kristoffersen et al., 2019). A prova de deteção do ITL é especialmente importante em condições pré-operatórias. Em geral, um aPTT aumentado, por estar altamente associado a elevado risco hemorrágico, leva à não realização da cirurgia. No entanto, se a prova indicar presença de ITL este é o único motivo pelo qual se pode prosseguir com o procedimento cirúrgico, porque apesar de originar um maior aPTT, não representa risco hemorrágico durante a cirurgia devido a estar associado, *in vivo*, a eventos fisiológicos trombóticos.

O fibrinogénio é uma glicoproteína fibrosa presente no plasma, sendo um elemento essencial para a formação da fibrina (Hoffbrand et al, 2016c). A metodologia usada na determinação quantitativa e qualitativa do fibrinogénio plasmático é a técnica de Clauss. Esta consiste na adição de uma solução de trombina em elevada concentração ao plasma diluído, sendo depois medido o tempo (em segundos) desde a adição de trombina até à formação da fibrina (Laffan et al., 2017). Menores tempos traduzem uma elevada atividade do fibrinogénio associado paralelamente a um maior risco de formação de coágulo. Os ensaios de fibrinogénio são úteis para o diagnóstico de afibrinogenemia (ausência de fibrinogénio), hipofibrinogenémia (concentrações reduzidas de fibrinogénio funcional), disfibrinogenémia (fibrinogénio disfuncional), coagulação intravascular disseminada, fibrinólise primária, e outras condições clínicas (Mackie et al., 2003; Winter et al., 2017). Vários estudos realizados mostraram que o nível de fibrinogénio é o preditor de uma variedade de eventos cardiovasculares, incluindo por exemplo o acidente vascular cerebral e o infarto do miocárdio (Mackie et al., 2003).

Por último, os D-Dímeros são o produto final da degradação da fibrina mediada pela plasmina. Assim, níveis elevados de D-Dímeros são indicadores da formação de fibrina (Winter et al., 2017). A determinação dos D-Dímeros é clinicamente relevante quando utilizado como parâmetro avaliador da exclusão da ocorrência de eventos trombóticos. Foi observado e demonstrado, em vários estudos, que níveis elevados de D-Dímeros avaliados após a suspensão da toma de anticoagulantes orais são indicadores de risco de trombose (Laffan et al., 2017a). Desta forma, pode-se concluir que uma prova de D-Dímeros negativa sugere a ausência de eventos tromboembólicos relacionados, nomeadamente, com tromboembolias pulmonares.

3.7. Cariótipo

No SPC é feito o estudo do cariótipo humano, usando-se técnicas de citogenética como a citogenética convencional. Para se estudar os cromossomas com esta técnica pressupõe-se que estes estejam em divisão ativa, pois os cromossomas só são visíveis ao microscópio ótico quando estão em metáfase. Neste serviço realizam-se estudos cromossómicos em amostras de sangue periférico ou em amostras medulares. No geral, o procedimento do estudo citogenético convencional inclui: preparação das amostras para cultura, processamento da cultura, manipulação celular, bandeamento e análise cromossómica. Após o bandeamento, técnica usada em citogenética para produzir um cariótipo visível pela coloração de cromossomos condensados, estes são analisados num microscópio ótico de modo a detetar anomalias numéricas e/ou estruturais (Chaves et al., 2013).

Os cromossomas podem também ser vistos com o auxílio do programa *Ikaros Karyotyping MetaSystems* que permite obter uma representação do cariótipo na forma de cariograma. A construção do cariograma tem por base uma fotografia ou o desenho detalhado de uma metáfase, onde se encontram todos os cromossomas bem corados e individualizados. O *software* permite separar os cromossomas para posterior identificação dos homólogos e emparelhamento destes (Chaves et al., 2013).

As doenças hematológicas estão frequentemente associadas a alterações cromossómicas específicas e dentro dessas doenças temos os linfomas, leucemias, doenças mieloproliferativas e mielodisplasias. A primeira alteração cromossómica associada a cancro hematológico foi em 1960, por Peter Nowell e David Hungerford, que identificaram o cromossoma Philadelphia (Ph) em sangue periférico de um paciente com leucemia mieloide crónica (LMC) (Kang et al., 2016). Por isso, deve ser sempre excluída a presença deste cromossoma nos doentes com suspeita desta patologia. O diagnóstico definitivo de LMC exige a demonstração da presença do cromossoma Ph, em resultado da translocação $t(9,22)$, por citogenética convencional (Jabbour et al., 2018). As síndromes mielodisplásicas (SMDs) compõem um grupo heterogéneo de doenças hemato-oncológicas, caracterizadas pelo aumento de citopenias no sangue periférico e que podem evoluir para leucemia mieloide aguda (LMA). Já a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) é um subtipo de LMA caracterizada por alterações genéticas específicas, nomeadamente pela translocação recíproca entre os cromossomas 15 e 17, ou seja, $t(15;17)$ (Yilmaz et al., 2021). A LPA apresenta-se como uma patologia hemato-oncológica agressiva e potencialmente fatal na ausência de tratamento adequado, sendo considerada uma emergência médica (Sanz et al., 2019). Deve ser feito em primeiro lugar o diagnóstico de pacientes com suspeitas de LPA e só

posteriormente feito o diagnóstico daqueles com suspeita de LMA, dentro daquilo que é considerado emergência médica. Isto porque um diagnóstico feito precocemente irá ditar uma terapêutica mais eficaz e atempada.

Assim, a contribuição da análise citogenética para a avaliação das doenças hemato-oncológicas é fundamental e necessária pois serve de auxílio ao diagnóstico, prognóstico e orientação terapêutica.

4. Setor de Imunologia

A imunologia, numa perspetiva mais abrangente, é o estudo das respostas imunológicas e dos eventos celulares e moleculares que ocorrem depois do organismo encontrar microrganismos e outras macromoléculas estranhas. O sistema imunitário é um sistema de defesa contra agentes infecciosos, contudo, até substâncias estranhas não infecciosas e produtos de células danificadas podem desencadear respostas imunes (Abbas et al., 2018).






O sistema imunitário funciona como uma “consciência molecular” do organismo, ou seja, é responsável por reconhecer e identificar sequências moleculares que lhe pertencem ou não. A imunologia é, hoje em dia, uma ciência básica mas bem desenvolvida, com base no crescente conhecimento da fisiologia do sistema imunitário (Al-Hakim, 1993).

O Setor de Imunologia do SPC está dividido em dois subsectores, nomeadamente a Imunologia Geral e a Autoimunidade. As análises imunológicas realizadas neste setor revelam-se extremamente relevantes e determinantes para apoio ao diagnóstico, acompanhamento e monitorização terapêutica de várias patologias, como é o caso das doenças autoimunes, imunodeficiências primárias, doenças associadas a distúrbios de células plasmáticas e/ou doenças linfoproliferativas, estudo das alergias, entre outras.

Para a determinação dos vários parâmetros imunoquímicos o laboratório do SPC possui equipamentos automatizados que se encontram descritos na Tabela 4, com a respetiva metodologia associada.

Tabela 4: Equipamentos do Setor de Imunologia e metodologia associada

EQUIPAMENTO	METODOLOGIA DO EQUIPAMENTO
Alinity c (Abbott); Alinity i (Abbott) 	Colorimetria, condutividade, turbidimetria; Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência melhorada
BN ProSpec® (Siemens) 	Nefelometria
Optilite® (Binding Site) 	Turbidimetria
Capillarys 2 Flex Piercing® (Sebia) 	Eletroforese Capilar (Proteinograma sérico)
ImmunoCap 250® (ThermoFisher Scientific) 	Imunoensaio Fluoroenzimático (FEIA)
Hidrasys 2® (Sebia) 	Eletroforese e Imunofixação Sérica e Urinária Isofocalização
TG Calibrating Viewer® (Transidyne General Corporation) 	Leitor de Imunodifusão Radial
Dynex DS2® Automated ELISA System (Dynex Technologies) 	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)
Micromass Quattro® micro API; Alliance2695® Separation Module (Waters) 	Especrometria de massa em tandem após separação por cromatografia líquida (LC-MSMS)
IF Sprinter® (EUROIMMUN) 	Imunofluorescência Indireta (IFI)
Mago 4® (Diamedix) 	ELISA, Preparação de lâminas de IFI

<p>EUROBlotOne® (EUROIMMUN)</p>		<p><i>Immunoblotting</i> (Western Blot)</p>
<p>EUROPattern® (EUROIMMUN)</p>		<p>Microscópio automatizado de alto desempenho para a captura das imagens de imunofluorescência</p>
<p>BioFlash® (Werfen)</p>		<p>Quimioluminescência (CLIA)</p>
<p>EuroImmuno Analyser</p>		<p>ELISA</p>
<p>Wallac Wizard 1470® Automatic Gamma Counter (PerkinElmer)</p>		<p>Contador de radiação gama para leitura de radioimunoensaios (RIA)</p>

4.1. Metodologias usadas em imunodiagnóstico

4.1.1. Nefelometria

A nefelometria é a metodologia mais utilizada na determinação da concentração de proteínas no soro, urina e noutros fluidos biológicos. Neste método, a luz dispersa pelos complexos antigénio-anticorpo é medida por um detetor (espectrofotómetro) posicionado num ângulo de 30 a 90°C relativamente à luz incidente (Figura 12). A intensidade da luz dispersa é, sob determinadas condições (excesso de anticorpo), proporcional à quantidade dos complexos de antigénio-anticorpo (Sunheimer et al., 2011). A quantidade e a natureza da dispersão dependem da forma e do tamanho das partículas, da concentração, do comprimento de onda e do índice de refração do meio (Barone et al., 2009).

A nefelometria pode ser aplicada para a deteção quer de antigénios, quer de anticorpos, porém é frequentemente usada com anticorpos conhecidos como reagentes, para pesquisar a presença do antigénio no doente.

No laboratório de Imunologia são quantificadas por este método no equipamento automatizado BN ProSpec os seguintes analitos:

Soro: Imunoglobulina D, subclasses das Imunoglobulinas G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), complemento C1q, inibidor do C1, properdina factor B, haptoglobina, pré-albumina, recetor solúvel da transferrina, apolipoproteína E, β 2-microglobulina urinária, cistatina C, proteína de ligação ao retinol (RBP), crioglobulinas (doseamento de IgG, IgA, IgM), fator reumatóide (FR), ADNase B, título anti-estreptolisina O;

LCR e Soro: Doseamento de IgG, doseamento de albumina;

Urina: Cadeias leves lambda(λ) e kappa (κ).

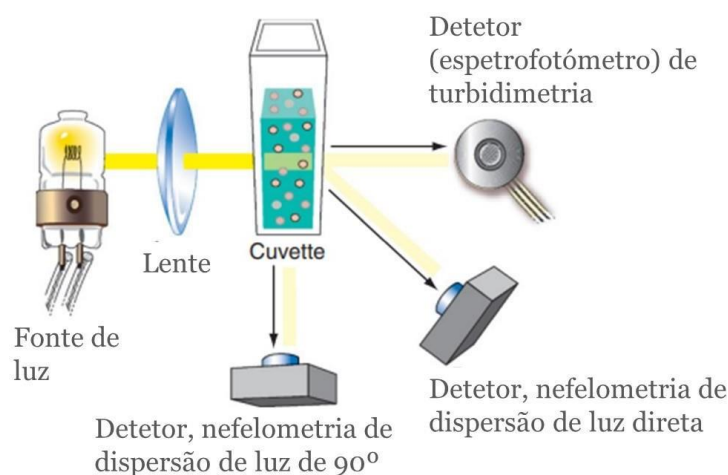


Figura 12: Nefelometria e turbidimetria. Adaptado de (Sunheimer et al., 2011)

4.1.2. Turbidimetria

A turbidimetria mede a diminuição da intensidade da luz que atravessa uma solução de complexos antigénio-anticorpo, resultado da reflexão, absorção e dispersão da luz incidente (Sunheimer et al., 2011). O detetor encontra-se na mesma direção que a luz incidente e, neste caso, a concentração do analito é inversamente proporcional à luz transmitida (Figura 12).

Com o auxílio do equipamento automatizado Optilite que usa esta metodologia quantificam-se no soro cadeias leves livres λ e κ , complemento CH50, subclasses IgA (IgA1 e IgA2) e Hevylite (IgG, IgA e IgM) e no LCR doseia-se cadeias κ livres. No aparelho Alinity c, situado no *Corelab*, no soro quantifica-se IgG, IgA, IgM, IgE, cadeias leves λ e κ , complemento C3 e C4, α 1-antitripsina, ceruloplasmina, transferrina, apolipoproteína A1, apolipoproteína B100, lipoproteína (a) e β 2-microglobulina, com base neste ensaio turbidimétrico. Nos líquidos biológicos a quantificação incide sobre IgG, IgA, IgM e complemento C3.

4.1.3. Eletroforese Capilar

A eletroforese é uma metodologia simples, rápida, sensível e de baixo custo que permite a separação de moléculas com base nas suas características, carga e peso molecular quando submetidas a um campo elétrico (O'Connell et al., 2005).

Na última década, a eletroforese capilar (EC) tem sido aplicada para uso em laboratórios clínicos, e é tida como específica e sensível na deteção de anormalidades qualitativas em proteínas séricas e noutros fluidos (McCudden et al., 2008). No laboratório de Imunologia do SPC a separação das proteínas séricas para a obtenção do proteinograma é realizada por EC no equipamento Capillarys 2 Flex Piercing de um modo totalmente automatizado.

O princípio da EC tem por base a existência de um tubo capilar, muitíssimo fino, de sílica fundida cuja parede interior é revestida por cargas negativas que atraem cargas positivas da solução eletrolítica (tampão), formando uma dupla camada elétrica e é criado um Fluxo Eletro Osmótico (FEO) superior ao campo elétrico. O soro é diluído num tampão alcalino, injetado no terminal anódico do capilar e as proteínas, apesar de carregadas negativamente, migram em direção ao terminal catódico do capilar onde é realizada a deteção e quantificação destas a 200 nm (SEBIA, 2021a).

O Capillarys 2 Flex Piercing utiliza 8 capilares permitindo, deste modo, a realização em simultâneo de 8 eletroforeses com separação das proteínas séricas em seis frações distintas: albumina; α 1-globulinas; α 2-globulinas; β 1-globulinas; β 2-globulinas e as γ -globulinas (Figura 13). Este equipamento permite realizar automaticamente toda a sequência da eletroforese, começando pela identificação do tubo de colheita até à obtenção do perfil eletroforético e consequente proteinograma. O *software* Phoresis associado ao Capillarys 2 Flex permite fazer a análise dos perfis eletroforéticos (correção do traçado, deteção, quantificação de proteínas monoclonais e inserção de comentários interpretativos dos resultados) e a sua transmissão informática para o programa Clinidata XXI.

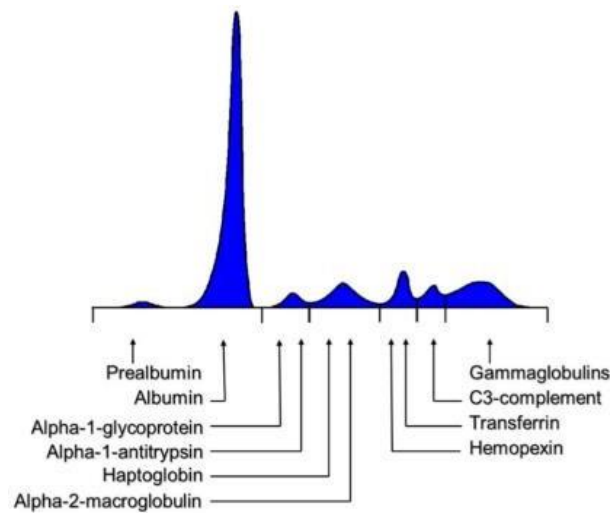


Figura 13: Principais proteínas constituintes das diferentes frações de um proteinograma obtido por eletroforese capilar. Adaptado de (Regeniter et al., 2018)

Esta análise dos resultados é realizada com o objetivo de detetar anomalias no perfil eletroforético (Figura 14). Numa abordagem clínica, a interpretação do traçado eletroforético (proteinograma) fornece informações importantes tais como: avaliação proteica, estado inflamatório agudo ou crónico, presença de imunodeficiências, entre outras. Contudo, hoje em dia, o papel relevante do proteinograma é sobretudo pela deteção de um componente monoclonal (população homogénea de imunoglobulina monoclonal ou um fragmento desta produzida como resultado de uma proliferação anormal de células plasmáticas) e, se possível, é feita a determinação da sua concentração para monitorizar a evolução da doença e a resposta à terapêutica (Regeniter et al., 2018).

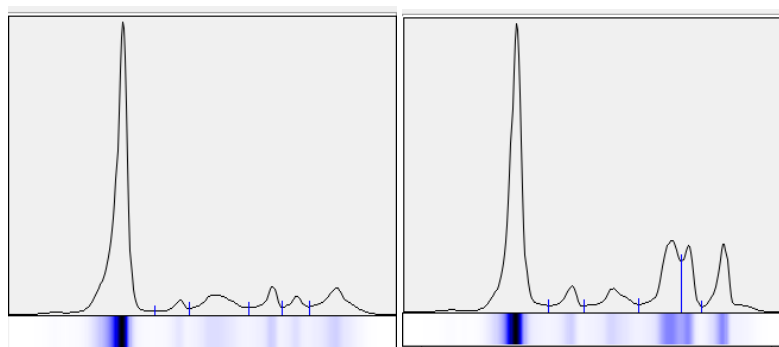


Figura 14: Proteinograma com o respectivo perfil eletroforético. Perfil eletroforético com presença de 1 pico na fração γ (proteína monoclonal), à esquerda. Perfil eletroforético com presença de 2 picos na fração β_2 e 1 pico na fração γ , à direita. (SPC, 2021)

4.1.4. Imunofixação

A imunofixação é um método imunológico para detetar, confirmar e caracterizar proteínas monoclonais no soro e na urina, nomeadamente permite

identificar o isotipo da imunoglobulina monoclonal (cadeia pesada e /ou leve). É particularmente útil na identificação e caracterização de gamopatias monoclonais, mielomas e doença de cadeias leves.

Imunofixação Sérica

A imunofixação deve ser realizada quando um pico ou banda é encontrada na eletroforese de proteínas séricas ou quando há suspeita de uma proteína monoclonal (Barone et al., 2009).

Esta técnica divide-se em 4 partes: separação (migração das proteínas); fixação e imunoprecipitação; lavagem e coloração. Depois da separação das proteínas séricas, por eletroforese em gel de agarose, o gel é incubado com diversos antissoros específicos (SEBIA, 2021b). Nesta fase os antissoros difundem-se no gel, e o fixador precipita todas as proteínas e os anticorpos correspondentes. Os antissoros usados são: anti-cadeias pesadas Gama (IgG), Alfa (IgA) e Mu (IgM) e anti-cadeias leves κ e λ . Estes antissoros são colocados no gel em poços individualizados, juntamente com o soro a analisar, de modo a identificar de forma qualitativa a natureza das bandas monoclonais. Antes da fase final que diz respeito à coloração das proteínas, o gel é processado de forma a remover-se o excesso de antissoros e as proteínas precipitadas são então retidas no interior da matriz do gel. Posteriormente, este gel é interpretado visualmente de forma a identificar a proteína monoclonal (proteína M) (SEBIA, 2021b).

Para além dos 5 antissoros usados na imunofixação típica, caso seja observada uma banda nas cadeias leves κ e λ que não seja associada a nenhuma das cadeias pesadas IgG, IgA ou IgM, é feita uma segunda imunofixação com os antissoros anti-cadeias pesadas Delta (IgD) e Epsilon (IgE) e anti-cadeias leves Kappa livres (κ l) e Lambda livres (λ l) (Singh, 2020). Algumas proteínas monoclonais, nomeadamente do isotipo IgA ou IgM, podem polimerizar dificultando a interpretação do resultado da imunofixação. Nestes casos utiliza-se uma solução redutora de Ditiotretol (DTT) (SEBIA, 2012).

O Laboratório de Imunologia do SPC utiliza o kit HYDRAGEL 4 IF e o sistema semiautomático HYDRASYS realiza as etapas até à obtenção do gel para interpretação (Figura 15).

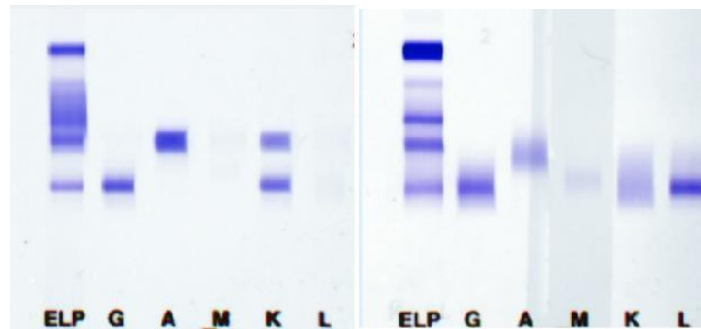


Figura 15: Géis com imunofixação sérica. Imunofixação sérica com presença de componentes biclonais à esquerda (IgG κ e IgA κ). Imunofixação sérica com presença de componente monoclonal à direita (IgG λ). (SPC,2021)

Imunofixação Pentavalente

Quando através da visualização do proteinograma não é visível nenhuma alteração e quando o clínico suspeita de proteína monoclonal e pede a realização da imunofixação, é efetuada uma imunofixação pentavalente, isto é, com um antissoro pentavalente anti-cadeias pesadas Gama (IgG), Alfa (IgA) e Mu (IgM) e anti-cadeias leves κ e λ (Turgeon Louise, 2014b). Esta técnica é realizada com o auxílio do kit HYDRAGEL 12 IF PENTA e, caso apareça uma banda que indica monoclonalidade, é realizada posteriormente uma imunofixação com os antissoros em separado para identificar o isotipo da proteína M. O HYDRAGEL 12 IF PENTA permite realizar em simultâneo doze imunofixações pentavalentes, sendo que as pistas assinaladas de “1” a “12” servem como referência e mostram o padrão eletroforético das proteínas da amostra e as assinaladas de “1” a “12” à imunofixação de cada amostra (Figura 16).



Figura 16: Gel pentavalente. Suspeita de proteína monoclonal no 6' através da visualização de uma banda no gel. Componentes policlonais nas restantes pistas. (SPC,2021)

Imunofixação urinária

Apesar do soro ser a amostra mais comum, a imunofixação também é realizada na urina das 24 horas. Na imunofixação urinária realizada no SPC, a pesquisa de imunoglobulinas monoclonais incide sobre as imunoglobulinas do tipo IgG, IgA, IgM, assim como nas cadeias leves κ e λ .

4.1.5. Caracterização de Proteinúrias

A caracterização de proteinúria é um teste útil para a avaliação da função renal. Em condições normais, é observada uma quantidade muito reduzida de proteína na urina. As situações de proteinúria podem ser consequência de lesão glomerular ou tubular ou excesso de proteínas de baixo peso molecular (D'Amico et al., 2003).

A caracterização de proteinúria é realizada no equipamento semi-automático HYDRASIS utilizando o kit HYDRAGEL 5 PROTEINURIE em urina de 24 horas não concentrada. O gel de agarose, existente neste kit, é um gel concentrado desenvolvido para separar as proteínas urinárias em função do seu peso molecular. A separação eletroforética das proteínas é efetuada após tratamento das amostras com dodecil sulfato de sódio (SDS) num tampão neutro (pH 7,0). O SDS é um detergente aniónico que, ao ligar-se às proteínas, mascara a sua carga intrínseca e as diferenças de migração entre as proteínas tratadas com SDS no gel devem-se somente ao peso molecular destas. Neste gel as proteínas de origem tubular (peso molecular < 65 - 70 kDa) e de origem glomerular (peso molecular > 65 - 70 kDa) são bem separadas (Figura 17). Assim, a proteinúria pode ser caracterizada em glomerular, tubular ou mista, de acordo com as proteínas presentes no gel. Os parâmetros da técnica e a sensibilidade do corante violeta ácido permitem a deteção de proteínas em urinas não concentradas (SEBIA, 2013).

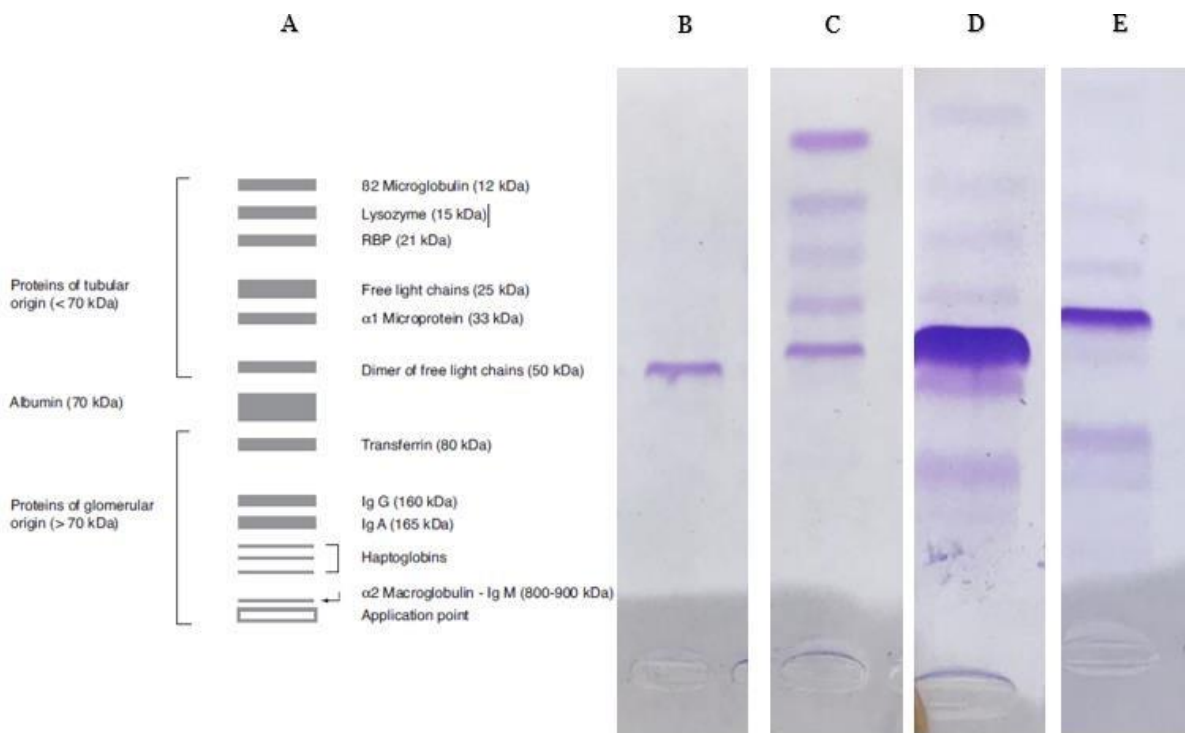


Figura 17: Caracterização de proteinúrias. A- Esquema ilustrativo de proteinúria patológica (SEBIA, 2013); B- Vestígios de albumina, C- Proteinúria de origem tubular, D- Proteinúria de origem mista com grande quantidade de albumina e presença de $\beta 2$ microglobulina, E- Proteinúria de origem mista com pequena quantidade de albumina (Lab. Imunologia SPC, 2021)

4.1.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos têm por base a formação e conseqüente deteção de complexos antígeno-anticorpo, através de enzimas ligadas a anticorpos. O que resulta da adição do cromogéneo (substrato da enzima) é um produto corado que é medido por espectrofotometria (Turgeon Louise, 2014d). Este ensaio depende de um anticorpo de captura que é usado para revestir uma placa *multi-well*, e um anticorpo de deteção que se encontra ligado covalentemente a uma enzima. Como dito anteriormente, esta reação enzimática pode gerar um produto corado, fluorescente ou luminescente dependendo do substrato utilizado (Hornbeck, 2015).

No laboratório do SPC é realizada ELISA para determinação quantitativa da elastase fecal e determinação da atividade funcional do inibidor do C1, sendo estes testes feitos no equipamento Dynex DS2.

A determinação da Elastase 1 Pancreática (E1) nas fezes é realizada por este método e tem por base o seguinte: a placa ELISA encontra-se revestida com um anticorpo monoclonal que reconhece unicamente a E1 pancreática humana. A E1 das amostras, calibradores e do controlo liga-se ao anticorpo imobilizado na placa. De

seguida, adiciona-se o complexo do anti-E1-biotina monoclonal e Peroxidase (POD)-Estreptavidina que se vai ligar à E1. A peroxidase oxida o substrato, que adquire uma cor verde escura. Por fim, a concentração do substrato oxidado é determinada fotometricamente, sendo proporcional à concentração de E1 presente na amostra (Lab.Imunologia SPC, 2021).

Quanto ao diagnóstico de autoimunidade, neste serviço, é feita a pesquisa de anticorpos Anti-Histonas; anticorpos Anti-Antigénio Hepático Solúvel e Pancreático (SLA/LP); anticorpos Anti-Piruvato Desidrogenase (IgG)- M2; anticorpos Anti-Cardiolipinas (IgG, IgM), anticorpos Anti- β 2-Glicoproteína I (IgG, IgM) (Amostras positivas por CLIA); anticorpos Anti-*Saccharomyces Cerevisiae* (ASCA) (IgA, IgG); anticorpos Anti-Fator Intrínseco, entre outros (Lab.Imunologia SPC, 2021). Esta pesquisa revela-se importante no diagnóstico de múltiplas doenças autoimunes (DAIs).

Com o auxílio dos kits usados no laboratório do SPC é feito ELISA e estes kits possuem tiras de microtitulação, cada uma com 8 poços de reagentes individuais revestidos com antígenos específicos a pesquisar. Na primeira etapa da reação, as amostras diluídas dos doentes são incubadas nos poços. No caso de amostras positivas, os anticorpos IgG específicos (também IgA e IgM) ligam-se aos antígenos. Para detetar os anticorpos ligados, é realizada uma segunda incubação utilizando uma imunoglobulina IgG anti-humana marcada enzimaticamente (conjugado enzimático), capaz de catalisar uma reação de cor (EUROIMMUN, 2017, 2018).

4.1.7. Imunodifusão Radial

O princípio desta técnica consiste na aplicação da amostra, que contém o antígeno que se pretende medir, num orifício cilíndrico de um gel contendo um anticorpo mono-específico da proteína em questão, uniformemente distribuído (Figura 18). A amostra difunde-se radialmente no gel, ocorre a formação do complexo antígeno-anticorpo, originando um halo (anel) de precipitação circular em torno do orifício onde esta foi aplicada, cujo diâmetro aumenta até atingir um equilíbrio entre a formação e a degradação desses complexos, designado por “ponto de equivalência”. Nesse ponto, existe uma relação linear entre o quadrado do diâmetro do halo de difusão e a concentração de antígeno. A partir da medição do diâmetro dos halos produzidos por amostras de concentrações conhecidas (calibradores) é possível construir uma curva de calibração e determinar a concentração do analito na amostra utilizando a análise de regressão linear (Barone et al., 2009). Esta técnica pode ser utilizada principalmente na quantificação de proteínas como imunoglobulinas e fatores do complemento, que no caso do laboratório de Imunologia são o C2 e C5.



Figura 18: Esquema ilustrativo da reação de imunodifusão radial, à esquerda. Adaptado de (Barone et al., 2009). Placa de gel de imunodifusão usada no laboratório do SPC, à direita.

A imunodifusão radial é uma técnica simples, fácil de executar e que não requer equipamento. Os halos de precipitação podem ser medidos, utilizando uma lupa ou um Leitor de Placas. Contudo, tem as suas limitações, tal como ser uma técnica morosa que implica um intervalo de tempo de 2 a 5 dias para obtenção dos halos de precipitação.

4.1.8. Reação de Waaler-Rose

A reação de Waaler-Rose (WR) permite pesquisar e titular-se fatores reumatóides que reagem com as IgG de coelho. No diagnóstico da Artrite Reumatóide (AR), pesquisam-se outros parâmetros, mas um dos que também se avalia é o Fator Reumatóide (FR) que é um anticorpo que reage com o fragmento Fc das IgG (Farng et al., 2011).

O princípio desta técnica é o seguinte: o antígeno, uma suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados com IgG de soro de coelho anti-eritrócitos de carneiro, aglutina na presença de fatores reumatóides (Monlab, 2013). Quando a suspensão de eritrócitos é colocada em contacto com o soro, se este tiver aumento de fatores reumatóides, observa-se uma aglutinação central nítida (concentração dos eritrócitos), após a leitura da placa, que só pode ser feita após 2 horas de ser realizado o ensaio.

Este ensaio manual apenas é realizado, no laboratório do SPC, depois de feito o teste por nefelometria, no aparelho automatizado, e o valor medido ser superior a 20 UI/mL. Uma vez que os FR produzidos na AR possuem uma reatividade significativa para as IgG de coelho, a reação de WR, embora menos sensível do que o teste de látex (imunoensaio), é mais específica no diagnóstico desta patologia.

4.1.9. Isofocalização

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória, caracterizada pela desmielinização e perda axonal (Cotsapas et al., 2018). Para o seu diagnóstico laboratorial é feita a pesquisa e caracterização de bandas oligoclonais no soro e LCR e quantificam-se IgG, albumina e cadeias leves κ livres também no soro e LCR. É calculado o quociente de albumina ($Q_{Alb} = \text{Alb(LCR)}/\text{Alb(soro)}$) e IgG (soro e LCR) (Lab.Imunologia SPC, 2021). Um diagnóstico desta patologia é feito pela avaliação da presença de marcadores inflamatórios, ou seja, observação de bandas oligoclonais, numa amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR), e/ou possuir um índice IgG elevado (Garg et al., 2015). Se a concentração de IgG no LCR for elevada, esta é devido a um “rompimento” da barreira hematoencefálica, logo o conteúdo de albumina será igualmente elevado (Chapel et al., 2014a). Contrariamente ao soro, a IgG no LCR é frequentemente de natureza restrita e forma bandas oligoclonais, isto é, são visíveis duas ou mais bandas no gel em vez de um aumento difuso (Chapel et al., 2014b).

O método empregue no laboratório do SPC é a focagem isoelétrica. Esta técnica separa as proteínas num gradiente de pH, são transferidas para uma membrana de nitrocelulose por *blotting* e esta membrana é imunofixada com um antissoro para a IgG. O padrão é interpretado e comparado com as amostras, testadas em simultâneo, de LCR e soro. Um resultado positivo é aquele em que bandas de IgG oligoclonais são encontradas no LCR, mas não no soro.

4.1.10. Espectrometria de Massa em Tandem

É sabido que, relativamente à transplantação, área de enorme sofisticação a nível tecnológico e científico, a avaliação do prognóstico e sobrevida média dos doentes deve-se principalmente à evolução e melhoria das técnicas cirúrgicas, como também aos avanços na terapêutica com fármacos imunossupressores. A maioria destes fármacos revelam ter uma estreita janela terapêutica, um elevado risco associado à ocorrência de eventos adversos e são bastante dispendiosos. Assim, por estas razões, revela-se importante uma constante monitorização para que se consiga aumentar a eficácia e evitar a toxicidade das drogas imunossupressoras (Carrondo, 2018). Assim, o papel do laboratório a nível do doseamento de imunossupressores para o auxílio da monitorização da terapêutica imunossupressora é tido como essencial para estes doentes.

Os imunossupressores podem ser divididos em inibidores da calcineurina (Ciclosporina e Tacrolimus) e inibidores da proliferação celular (Sirolimus e

Everolimus), sendo os quatro doseados no laboratório do SPC (Lab.Imunologia SPC, 2021).

A Ciclosporina e o Tacrolimus inibem a produção de interleucina-2 (IL-2) e a formação dos linfócitos T. Por outro lado, o Sirolimus inibe as cinases designadas mTOR (*mammalian targets of rapamycin*) (Allison, 2016), impedindo a proliferação das células T por bloqueio da progressão da fase G1 para a S do ciclo celular. Este não inibe a síntese das citocinas mas bloqueia o sinal de transdução gerados pelos recetores das citocinas e consequentemente da IL-2. O Everolimus é um derivado do Sirolimus com um mecanismo de ação idêntico (Meireles, 2018).

Atualmente o doseamento da Ciclosporina, Tacrolimus e Sirolimus é realizado no Alinity i (Abbott), situado no Core Lab, por quimioluminiscência melhorada (CHEMIFLEX). O Everolimus é o único a ser doseado por um método diferente, que é a espectrometria de massa após separação por cromatografia líquida (LC-MSMS).

Com o método LC-MSMS, após a separação cromatográfica, os imunossuppressores são ionizados (sendo a fonte de ionização, à pressão atmosférica, do tipo “*electrospray*”) e, então, separados de acordo com a sua relação massa/carga elétrica e detetados por um sistema de deteção (Deters et al., 2003).

4.1.11. Imunoensaio Enzimático de Fluorescência (FEIA)

O ImmunoCAP 250 da Phadia permite efetuar o estudo dos alérgenos através do doseamento das IgEs específicas, através de um imunoensaio enzimático de fluorescência (FEIA). Este ensaio é usado para um amplo painel de alérgenos, painel esse sensibilizado para a deteção de 650 alérgenos e 90 componentes alérgénicos, tais como: alérgenos isolados (extratos totais de alimentos, ácaros, gramíneas, árvores, ervas infestantes, epitélios e proteínas animais, insetos, microrganismos, venenos, fármacos e outros) e alérgenos moleculares (avaliação e estudo de reatividade cruzada através do doseamento de IgE específica dos componentes moleculares). Também é possível o doseamento da triptase, IgG específica e IgG4 específica através deste equipamento (Stop, 2013).

A pesquisa de IgE e IgG, numa abordagem alérgica, é feita por FEIA, no equipamento automatizado ImmunoCAP 250. O diagnóstico de alergia tem por base a quantificação dos níveis de IgE específica no soro do doente, tendo sempre em conta história e restante informação clínica. Se for detetada uma quantidade aumentada de IgE total ou de uma IgE específica, no soro, traduz-se numa maior probabilidade de haver uma reação alérgica ou infeção por parasitas (Park et al., 2018).

Os ensaios ImmunoCAP são baseados na ligação de anticorpos, por exemplo IgE específicos para alérgenos, presentes no soro ou outros fluidos corporais do paciente, ao alérgeno (extrato ou molécula de alérgeno) ligado em excesso a uma fase sólida. Quando ocorre o reconhecimento dos alérgenos pelos anticorpos, forma-se um complexo antigénio-anticorpo e posteriormente há uma fase em que se liga um anticorpo secundário anti-IgE a este complexo, conjugado com uma enzima. Isto resulta na formação de um imunocomplexo. É emitido um sinal de fluorescência pela adição do substrato da enzima. A medição e a comparação deste sinal de fluorescência com o de calibradores (concentrações conhecidas) permitem a determinação da concentração de IgE específica na amostra (van Hage et al., 2017). O mesmo princípio pode ser aplicado para pesquisa de IgG específica.

Quanto ao diagnóstico autoimune, usando esta metodologia, este incide sobre a pesquisa de anticorpos Anti-dsDNA; anticorpos Anti-Mieloperoxidase (MPO), Anti-Proteinase 3 (PR3); anticorpos Anti-Piruvato Desidrogenase (IgG) - M2; anticorpos Anti-Transglutaminase Tecidual (IgA e IgG), Anti-Gliadina Desanimada (IgA e IgG) e anticorpos Anti-Peptídeo Citrulinado Cíclico (CCP).

4.1.12. Imunofluorescência Indireta (IFI)

A imunofluorescência indireta envolve dois passos no processo de incubação: 1) um anticorpo primário liga-se ao epítipo alvo, 2) anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo que reconhece e se liga ao anticorpo primário (Im et al., 2019). Ou seja, nesta metodologia, o primeiro passo corresponde ao anticorpo específico a pesquisar, que estará presente na amostra diluída do paciente, que se liga ao antigénio ligado à fase sólida. A etapa seguinte consiste na ligação de um anticorpo, marcado com o fluoróforo, ao anticorpo específico da amostra do paciente (EUROIMMUN, 2021a). Estas células são permeabilizadas com o intuito de permitir a entrada do autoanticorpo, que pode estar presente ou não na amostra de soro. A lâmina é incubada com a amostra de soro, e caso haja presença de autoanticorpos, dar-se-á a formação do complexo antigénio-anticorpo (imunocomplexo) (Barone et al., 2009).

A formação do imunocomplexo e consequente deteção da fluorescência é possível pelo uso do fluoróforo, usualmente é o isotiocianato de fluoresceína (FITC), conjugado ao segundo anticorpo, que emite luz verde quando excitado por luz com um comprimento de onda inferior (Im et al., 2019). São usados microscópios de fluorescência ou leitores de placas para a deteção e estes contêm filtros específicos para

cada comprimento de onda emitido. Os fluoróforos convencionais como o FITC emitem luz no comprimento de onda de 550 nm (Koivunen et al., 2006).

Este método indireto de fluorescência é amplamente utilizado pela sua elevada sensibilidade, sinal de amplificação e pela sua habilidade para detetar vários alvos na mesma amostra (Im et al., 2019).

4.1.13. Radioimunoensaio (RIA)

O radioimunoensaio (RIA) é uma metodologia de quantificação que envolve quatro aspetos essenciais: 1) a substância a ser medida (anticorpo); 2) a substância purificada e marcada com radioisótopo (antigénio), da mesma espécie química que a substância a ser quantificada, 3) anticorpo específico com grande afinidade pela substância a medir; 4) processos de separação do complexo antigénio-anticorpo (Mantovani et al., 2011). O princípio do RIA preconiza a determinação da quantidade de anticorpos ligados a antigénios marcados com radioisótopo, com o auxílio de um contador de radiação gama.

No subsector de autoimunidade do SPC é possível a determinação quantitativa dos autoanticorpos Anti-dsDNA, através de RIA, para o controlo e monitorização de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico (LES). Isto porque autoanticorpos Anti-dsDNA têm sido detetados no soro e em tecidos de pacientes com LES. No entanto, são também encontrados em indivíduos sem esta patologia, sendo bastante propenso o desenvolvimento desta doença nestes pacientes (Yu et al., 2007).

Também é possível, neste serviço, numa abordagem autoimune, a pesquisa de anticorpos Anti-Insulina, anticorpos Anti-Receptor da Acetilcolina e Anti-MuSK.

4.1.14. Quimioluminescência (CLIA)

O princípio da quimioluminescência, imunoensaio que está na base do funcionamento do equipamento BIO-FLASH®, diz respeito à emissão de luz quando um eletrão, que está num estado excitado, transita para um nível energético menor. A excitação é causada por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico por um agente oxidante (Cinquanta et al., 2017).

A quimioluminescência envolve então a oxidação de um composto orgânico (por exemplo luminol) por um agente oxidante (peróxido de hidrogénio, hipoclorito ou oxigénio). Esta reação de oxidação normalmente ocorre na presença de catalisadores,

como enzimas (por exemplo fosfatase alcalina). Os produtos excitados resultantes da reação de oxidação produzem quimioluminescência no retorno ao seu estado basal e esta é detetada por um luminómetro (Koivunen et al., 2006).

O imunoensaio por CLIA assenta no seguinte: as amostras dos pacientes são pré-diluídas pelo equipamento BIO-FLASH® com uma solução tampão, sendo depois combinadas pequenas quantidades da amostra diluída, as esferas paramagnéticas e o tampão. De seguida, é adicionado o anticorpo conjugado com isoluminol. Após a etapa final de lavagem que o equipamento realiza, este transporta uma cuvette, que contém as partículas paramagnéticas, para o luminómetro, onde o agente oxidante e um catalisador são injetados. No luminómetro, a molécula emissora de luz (um derivado do luminol) produz luz que é medida então como um valor numérico, isto é, como unidades de luz relativa (ULR). As ULRs são proporcionais à quantidade de conjugado de isoluminol que é ligado ao anticorpo, que por sua vez é proporcional à quantidade de autoanticorpos ligados ao antigénio alvo covalentemente ligado às partículas paramagnéticas (Mahler et al., 2016). No laboratório do SPC são quantificáveis os seguintes anticorpos: Anti-DFS70; Anti-SSA, Anti-SSB; Anti-Sm, Anti-RNP; Anti-Membrana Basal Glomerular; Anti-Cardiolipinas (IgG, IgM) e Anti- β 2-Glicoproteína I (IgG, IgM).

As principais vantagens deste ensaio dizem respeito à elevada intensidade do sinal, ausência de interferentes na emissão de luz (elevada especificidade), rápida aquisição do sinal do analito e também a elevada estabilidade dos reagentes e dos seus conjugados (Cinquanta et al., 2017).

4.1.15. Immunoblotting

Através da metodologia de *immunoblot*, os antigénios impregnados na membrana são usados como fase sólida, a fim de detetar anticorpos específicos na amostra do paciente. Se na amostra estiverem presentes os anticorpos específicos, estes irão ligar-se aos antigénios fixados na membrana. Na etapa seguinte, um anticorpo marcado com fosfatase alcalina (conjugado) é adicionado, e irá ligar-se aos anticorpos específicos em estudo, se presentes, e conseqüentemente formar-se-á um imunocomplexo. A fosfatase alcalina catalisa uma reação de cor com um substrato que é subseqüentemente adicionado. Caso os anticorpos específicos estejam presentes na amostra, deverá aparecer uma linha escura na posição do respetivo antigénio. A intensidade da coloração resultante (linha escura, clara ou ausência de linha) é

proporcional à concentração de anticorpos na amostra (EUROIMMUN, 2021b; Sternbæk et al., 2019).

No laboratório do SPC, no subsetor de Autoimunidade, utiliza-se o ensaio EUROLINE que tem por base esta metodologia para diagnosticar DAIs do tecido conjuntivo, Esclerose Sistémica, Vasculite e Doença Hepática Autoimune. São também pesquisados autoanticorpos associados a Colangites, Miosites, Polineuropatias Autoimunes e Síndromes Paraneoplásicas.

Este ensaio utiliza uma tira comercial em que estão presentes os diferentes antigénios a pesquisar, tendo em conta as diferentes patologias em estudo. Em cada tira de teste existe uma banda de controlo que indica se a incubação foi realizada corretamente (Figura 19). O ensaio realizado no equipamento EUROBlotOne está automaticamente associado ao *software* EUROLineScan (EUROIMMUN, 2021b).

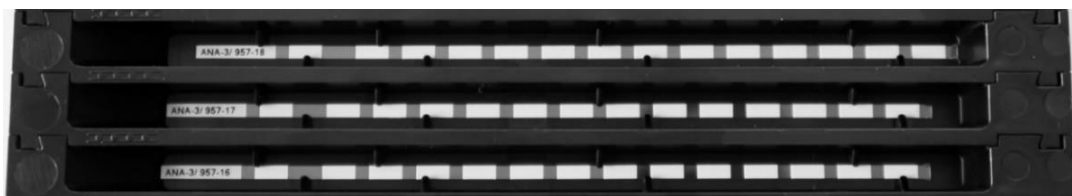


Figura 19: Tiras de teste de Immunoblotting para pesquisa de Anticorpos Anti-Nucleares (ANA). Adaptado de (c, 2021b).

4.2. Estudo de Gamopatias Monoclonais

As gamopatias são patologias caracterizadas pela anormal distribuição e/ou concentração das imunoglobulinas plasmáticas. As gamopatias monoclonais dizem respeito a uma condição na qual um único clone de células plasmáticas produz níveis elevados de uma única classe e tipo de imunoglobulina. A imunoglobulina aumentada é referida como proteína monoclonal (PM), proteína M ou paraproteína. As gamopatias monoclonais podem ser sugestivas de malignidade, como é o caso do mieloma múltiplo (MM) ou macroglobulinémia. A classe (cadeia pesada) e o tipo (cadeia leve) devem ser definidas porque o prognóstico e o tratamento de um paciente são diferentes, dependendo da imunoglobulina envolvida (Turgeon Louise, 2014c).

Também pode existir elevação policlonal das imunoglobulinas, sendo estas causadas por distúrbios como doença hepática, artrite reumatóide e infeção crónica. É uma condição que se caracteriza pela elevação de duas ou mais imunoglobulinas, produzidas por vários clones de células plasmáticas (Turgeon Louise, 2014c).

Quanto ao seguimento de doentes com suspeita de gamopatias é necessário ter em conta a história clínica destes doentes e um exame físico. É solicitado um hemograma com leucograma com observação do ESP, determina-se a VS, faz-se

doseamento de creatinina, cálcio, albumina, proteínas totais, LDH e β 2-microglobulina. É caracterizada a proteinúria na urina de 24 horas e albuminúria. Faz-se, adicionalmente, uma eletroforese e imunofixação de proteínas do soro e da urina. Através dos equipamentos automatizados existentes no laboratório doseiam-se imunoglobulinas séricas e cadeias leves livres (CLL) (Lab.Imunologia SPC, 2021).

4.3. Patogénese Autoimune

As DAIs são o resultado de um funcionamento anómalo do sistema imunitário onde, erroneamente, este ataca os seus próprios antígenos. Estas doenças são agrupadas em autoimunes específicas de órgão e não específicas (sistémicas). Os anticorpos são importantes biomarcadores usados no diagnóstico de DAIs. Os autoanticorpos (AAC) específicos de certas patologias podem ser detetados num estadio em que os sintomas clínicos ainda não se manifestaram, permitindo prever a severidade da doença. Assim, um diagnóstico feito num estadio inicial é essencial para diminuir a morbilidade e mortalidade causadas pelas DAIs. Os AAC que reagem com antígenos específicos de um órgão ou tecido estão intimamente ligados a doenças autoimunes órgão-específicas (Chauhan et al., 2019).

No SPC, quando há uma suspeita de uma DAI, primeiramente efetua-se a pesquisa de Anticorpos Anti-Nucleares (ANA) e de Anticorpos Anti-Antígenos Nucleares Extraíveis (ENA), sendo pesquisados paralelamente com outros parâmetros tendo em conta a avaliação que é feita pelo clínico. Encontra-se no Anexo I o algoritmo de identificação das diferentes patologias, bem como os conjuntos dos anticorpos que as caracterizam, sendo esse o algoritmo base seguido pelo laboratório do SPC.

4.4. Estudo e Monitorização de Doenças Autoimunes (DAIs)

Anticorpos Anti-Nucleares (ANA)

A presença de ANA está associada a diversas patologias reumatóides sistémicas, como LES, Esclerose Sistémica, entre outras (Bossuyt et al., 2020). Em várias DAIs sistémicas estão presentes estes anticorpos e a sua deteção integra-se na etapa inicial do diagnóstico. A pesquisa de ANA por IFI é o método *gold standard* e utiliza como substratos células HEp-2, que dizem respeito a células epiteliais do carcinoma da

larínge (M. J. Sousa et al., 2021). Esta linha celular é usada devido ao elevado número de células em mitose, por possuírem uma boa morfologia celular e por expressarem antígenos relevantes (Buchner et al., 2014). Os ANA caracterizam-se por serem um grupo de AAC que se ligam a antígenos não só presentes no núcleo, como também no citoplasma e aparelho mitótico das células (Sack et al., 2009).

As células HEp-2 são cultivadas em lâminas e incubadas com o soro diluído do doente. As lâminas são então digitalizadas no microscópio de fluorescência, que faz precisamente a aquisição de imagens de imunofluorescência. Este está associado ao EUROLabOffice (ELO), *software* que faz a interface entre os aparelhos da EUROIMMUN e o sistema informático usado no laboratório do SPC, sendo as imagens interpretadas e validadas nesta fase. Como parte integrante da interpretação da imagem obtida faz parte a distinção e a caracterização de diferentes estruturas celulares como membranas nucleares, nucleoplasma, nucléolos, aparelho mitótico, complexos de Golgi, ribossomas, mitocôndrias e fibras do citoesqueleto. Na avaliação e deteção de ANA por IFI/HEp-2 é importante, primeiramente, identificar a presença/ausência de AAC na amostra, revelada pelo sinal de fluorescência verde emitido, aquando da irradiação da lâmina com luz UV. O segundo aspeto importante é o título de anticorpo, isto é, este título é um fator semi-quantitativo da concentração de anticorpo no soro, tendo em conta a intensidade da fluorescência observada (Damoiseaux et al., 2019). Terceiro, realiza-se a identificação de ANA, tendo em conta a padronização de imunofluorescência (AC-0 a AC-29) definida pelo ICAP (*International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns*) baseada nas diferentes estruturas celulares identificadas (Anexo II). Para cada autoanticorpo com uma fluorescência e localização particular, que estão padronizadas, haverá um autoantígeno correspondente (Sousa et al., 2021).

Apesar desta identificação de padrões nas células HEp-2, é necessário validar complementarmente este resultado com testes de *follow-up*, para confirmar a presença da especificidade anticorpo-antígeno e, assim, se poder dar um diagnóstico correto (Damoiseaux et al., 2019).

Anticorpos Anti-Antígenos Nucleares Extraíveis (ENA)

Existem antígenos associados ao diagnóstico de DAIs que estão localizados no núcleo, entre os quais os Antígenos Nucleares Extraíveis (ENA), macromoléculas ácidas extraídas das frações salinas solúveis das células (Moore et al., 1981). Os ENA constituem um grupo heterogéneo de ribonucleoproteínas e proteínas nucleares não-histonas com diferentes funções no metabolismo nuclear (Wenzel et al., 2001). Os

Anticorpos Anti-Antígenos Nucleares Extraíveis (anti-ENA) pertencem ao subgrupo de autoanticorpos ANA (Moore et al., 1981). Assim, a presença de anti-ENA está intimamente relacionada com os diversos padrões de imunofluorescência de ANA relacionados às diferentes DAIs.

Alguns ENA apresentam elevada especificidade para determinada patologia (p. ex.: Scl-70 e Esclerose Sistémica) enquanto outros podem encontrar-se num amplo espetro de doenças (Barros, 2019).

Nos testes laboratoriais realizados diariamente no SPC faz parte a aplicação da metodologia CLIA, rentabilizando-se a deteção automatizada, incidindo sobre a pesquisa simultânea de anticorpos anti-ENA, nomeadamente anti-SSA (Ro60), anti-Ro52/TRIM21, anti-SSB (La), anti-Sm, anti-RNP, anti-Scl70 (DNA topoisomerase 1) e anti-Jo1 (Lab.Imunologia SPC, 2021). Se o resultado da pesquisa for positivo, posteriormente faz-se a pesquisa de anti-Scl70 e anti-Jo1 por *Immunoblotting* e/ou procede-se à identificação de anticorpos anti-SSA, anti-SSB (La), anti-Sm e anti-RNP por CLIA.

Anticorpos Anti-Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA)

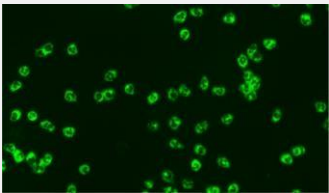
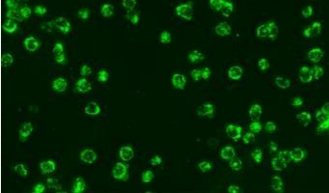
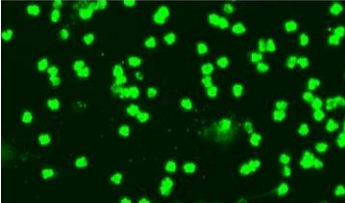
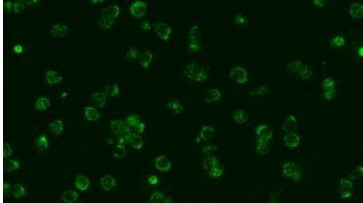
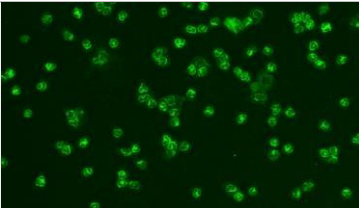
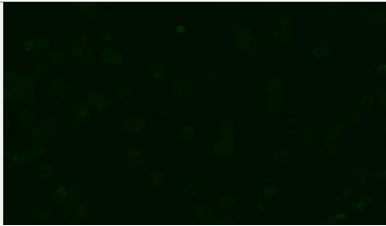
Anticorpos Anti-Citoplasma dos Neutrófilos dizem respeito a AAC que reagem com proteínas expressas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos polimorfonucleares (Weiner et al., 2016). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação e são dos primeiros a intervir na resposta imune quando há estímulos infecciosos e não infecciosos. Foi sugerido que, em alguns indivíduos, a ativação de neutrófilos, inadvertidamente, origina o aparecimento de ANCA contra determinadas proteínas (antígenos), como a mieloperoxidase (MPO) e a proteinase 3 (PR3). Isto é, nesses indivíduos, acredita-se que estas interações contínuas que ocorrem entre ANCA-antígeno conduzam a uma persistente ativação dos neutrófilos, levando ao desenvolvimento de DAIs, como por exemplo vasculites autoimunes (Sundqvist et al., 2020).

Primeiramente, a pesquisa de ANCA é feita por IFI e esta metodologia utiliza como substratos neutrófilos fixados a lâminas em meio de etanol e formalina. Quando observadas, as lâminas, ao microscópio de fluorescência, os ANCA podem apresentar, mais frequentemente, um dos dois padrões: c-ANCA: padrão citoplasmático granular; ou p-ANCA: padrão perinuclear. No entanto, existem ANCA atípicos designados por x-ANCA (Tabela 5).

A fluorescência do tipo c-ANCA, maioritariamente devido a AAC anti-PR3, é localizada no grânulo azurófilo (Sundqvist et al., 2020). Por outro lado, a fluorescência

do tipo p-ANCA pode ser causada por AAC contra várias especificidades: anticorpos anti-MPO, anti-PR3, elastase, lactoferrina, lisozima, catepsina G, BPI, glucuronidase e azurocidina (Sundqvist et al., 2020). O padrão de fluorescência característico dos x-ANCA, por IFI, é um padrão muito perinuclear em meio de etanol e em formalina é negativo. Caso as amostras sejam positivas por IFI, no laboratório do SPC é feita, posteriormente, a identificação e quantificação da especificidade antigénica e enzimática, por FEIA.

Tabela 5: Padrões de ANCA (Lab. Autoimunidade SPC, 2021)

	MEIO: ETANOL	MEIO: FORMALINA
c-ANCA		
p-ANCA		
x-ANCA		

Mosaicos para IFI

No laboratório do SPC, a IFI é realizada também para a determinação qualitativa e semi-quantitativa, *in vitro*, de anticorpos humanos IgG anti-nucleares (ANA); anti-mitocôndrias (AMA); anti-músculo liso (ASMA), anti-F-actina; anti-LC1 (*Liver Cytosol Type 1*) e anti-microsomas do fígado e rim (LKM) em pacientes para diagnosticar variadas DAIs do fígado, nomeadamente Hepatites Autoimunes e Colangite Biliar Primária. Para o diagnóstico de Anemia Perniciosa é feita a pesquisa de anticorpos Anti-Células Parietais Gástricas, que utiliza como substratos cortes de estômago. Quanto ao diagnóstico de Dermatoses Autoimunes a pesquisa incide sobre

anticorpos anti-pele, usando um mosaico dermatológico como substrato (Lab.Imunologia SPC, 2021).

A deteção de ASMA, anticorpos anti-F-actina, anti-LKM, anti-LC1 e AMA passa por utilizar como substrato: cortes de mucosa gástrica, rim e fígado de rato e, células de cultura da aorta de rato (VSM) (Figura 20).

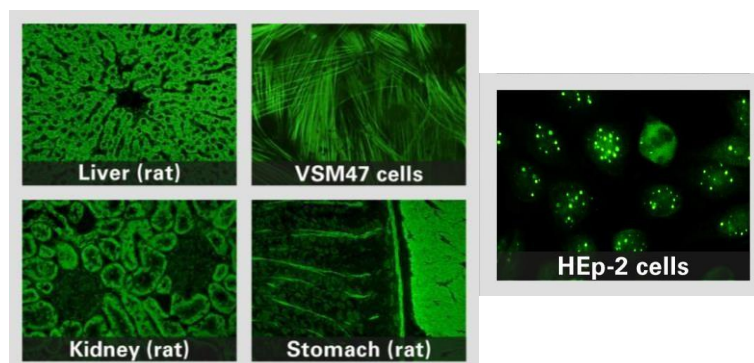


Figura 20: Imagens de IFI com os diferentes substratos utilizados no laboratório do SPC (EUROIMMUN®)

5. Setor de Microbiologia

A microbiologia é um ramo da ciência que estuda as interações entre seres humanos e microrganismos (bactérias, vírus, fungos e parasitas). Embora estes últimos sejam agentes causadores de muitas doenças infecciosas, alguns deles não são patogénicos e fazem parte do nosso organismo constituindo a flora normal ou microbiota normal (Tille, 2017b). Um microrganismo só é patogénico quando é capaz de causar doença, sendo essencial um diagnóstico laboratorial atempado, a fim de identificar o organismo em causa e poder responder com uma terapêutica eficaz.

O setor de Microbiologia engloba os subsectores de Bacteriologia, Micobacteriologia, Micologia, Parasitologia e Serologia. Este setor encontra-se organizado em várias salas: uma sala onde se rececionam, integram e se processam as amostras biológicas; salas com aparelhos auxiliares ao diagnóstico microbiológico; sala de microscópios; sala de refrigeração e estufas; sala de arrumação de material e também gabinetes de validação. Na tabela seguinte (Tabela 6) encontram-se os equipamentos que fazem parte deste setor e respetiva metodologia associada.

Tabela 6: Equipamentos do Setor de Microbiologia e metodologia associada

EQUIPAMENTO	METODOLOGIA DO EQUIPAMENTO
Sysmex UF-5000 (Sysmex Corporation)	Citometria de fluxo com fluorescência



<p>AUTOPLAK (Beckman Coulter)</p> 	<p>Sementeira automatizada de urinas (sementeira por esgotamento)</p>
<p>BacT/ALERT® 3D (bioMérieux)</p> 	<p>Colorimétrica</p>
<p>MALDI-TOF Biotyper® (Bruker)</p> 	<p>Dessorção Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo (MALDI-TOF) associado a espectrometria de massa</p>
<p>MicroScan WalkAway (Beckman Coulter)</p> 	<p>Absorvância (Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA) automatizados)</p>
<p>Accelerate Pheno™ system (Accelerate Diagnostics)</p> 	<p>Hibridização por fluorescência <i>in situ</i> (FISH) automatizada para uma rápida identificação genómica dos agentes infecciosos</p>
<p>Novodiag® System</p> 	<p><i>Real Time- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i></p>
<p>GeneXpert® (Cepheid)</p> 	<p><i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i></p>
<p>VitaPCR™ (Credo Diagnostics)</p> 	<p>PCR</p>
<p>BACTEC™ 9120™ (Becton Dickinson, BD)</p> 	<p>Fluorimétrica (libertação de um composto fluorescente devido ao consumo de O₂)</p>

BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, BD)



Fluorimétrica (libertação de um composto fluorescente devido ao consumo de O₂)

5.1. Bacteriologia

O procedimento laboratorial em Bacteriologia engloba a sementeira da amostra, a incubação e avaliação da cultura, o isolamento, a identificação e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) do(s) microrganismo(s) presente(s) na amostra biológica.

5.1.1. Diagnóstico laboratorial em bacteriologia

No diagnóstico bacteriológico, a aplicação das técnicas de coloração permite distinguir o tipo de bactérias tendo em conta a composição química da parede celular. As bactérias Gram-positivo retêm o corante primário cristal de violeta e coram de roxo, enquanto as bactérias Gram-negativo de cor-de-rosa. Nestas últimas o corante cristal de violeta é eliminado pelas lavagens com a solução de álcool/acetona, ficando incolores, e apenas estas retêm a coloração do segundo corante (fucsina) que é adicionado de seguida. As lâminas coradas são observadas ao microscópio ótico com a objetiva de imersão (Levinson, 2011a; Tille, 2017i).

Meios de Cultura

É importante realizar-se a cultura de uma amostra para tornar possível o crescimento e isolamento dos microrganismos para que se consiga determinar, posteriormente, quais os potenciais causadores de infeção.

As bactérias não têm todas as mesmas necessidades nutricionais, sendo necessário um meio de cultura apropriado aquando da sementeira dos produtos biológicos diretamente nos meios. Após a sementeira, as culturas são incubadas na estufa com temperatura, humidade e atmosfera controladas e adequadas ao seu desenvolvimento. A duração das culturas depende da capacidade replicativa dos microrganismos (Azinheira et al., 1998).

Quanto às condições ótimas e adequadas a cada tipo de bactéria, temos de considerar os seguintes fatores: disponibilidade de oxigénio- existem bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas; concentração de CO₂- uma concentração de 0,03% para bactérias aeróbias e entre 5 a 10% de CO₂ para culturas de microrganismos anaeróbios; temperatura, ou seja, os microrganismos patogénicos multiplicam-se mais facilmente a uma temperatura semelhante àquela que encontram nos tecidos que colonizam, ou seja, a 37°C (com exceções, como é o caso de *Campylobacter spp.* que tem o seu crescimento favorecido a 42°C); pH- varia entre 6,5 e 7,5 mas geralmente os meios de cultura utilizados são comercializados já com o pH ideal; humidade- a água revela-se essencial também para uma cultura visto que as bactérias a usam nas suas vias metabólicas (Carroll et al., 2006a; Tille, 2017c).

Técnicas de Sementeira

O processamento do produto biológico envolve a realização da técnica de sementeira, que varia dependendo da amostra. A sementeira em meios de cultura sólidos (na placa) é feita por espalhamento com ansa ou zaragatoa com o objetivo de obter colónias isoladas (sementeira por esgotamento) (Tille, 2017j) .

No caso da urina, a inoculação é feita com auxílio de uma ansa (de 1 µL no SPC) e deve permitir uma avaliação semi-quantitativa das colónias (Fonseca et al., 2004).

O processamento dos catéteres é diretamente no meio sólido e a inoculação faz-se por rolamento (Tille, 2017a).

Para amostras em que os microrganismos se encontram em baixas concentrações como o LCR, o sugerido é uma inoculação por inundação (Tille, 2017a).

A inoculação de amostras em meio líquido é feita por adição direta do produto biológico ao meio, seguida de uma homogeneização (Tille, 2017a).

5.1.2. Produtos biológicos

No laboratório de Microbiologia do SPC é rececionada uma grande variedade de produtos biológicos e apenas será referido o processamento laboratorial de alguns deles: urina, sangue, fezes, LCR, exsudados vaginais, líquidos (peritoneal, pleural, sinovial) e produtos respiratórios (expetorações, aspirados brônquicos e lavados brônquicos) (ANEXO III).

Urinas

As infeções do trato urinário (ITU) são as mais comuns, resultam da multiplicação de microrganismos no trato urinário, daí as amostras de urina serem as mais frequentes no Laboratório de Microbiologia. Considera-se como ITU a presença de microrganismos na urina, com possível invasão e reação das estruturas presentes nos órgãos do aparelho urinário (Correia et al., 2007).

A colheita de urina por micção (jato médio) para análise laboratorial é feita, após a higienização da zona genital, para um contentor e seguidamente é colocada num tubo de ácido bórico para ser transportada (Fonseca et al., 2004). O ácido bórico é importante na medida em que estabiliza a população bacteriana presente na amostra, preservando as características da mesma e possibilitando o seu armazenamento à temperatura ambiente até 24 horas, caso não seja possível a refrigeração imediata (Carroll et al., 2006b).

De notar que existem ainda outros tipos de colheita de amostras de urinas tais como punção de catéter urinário, punção supra-púbica e drenagem de nefrostomia (Fonseca et al., 2004).

No caso do SPC, todos os tubos de urina passam primeiramente pelo Sysmex UF-5000, aparelho de citometria de fluxo que avalia vários parâmetros na urina tais como: eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, bactérias, cristais, leveduras, entre outros. É gerado um alarme (segundo os *cut-offs* definidos) caso a amostra de urina apresente leucócitos, leveduras ou bactérias em elevado número, dando uma informação sugestiva da presença de ITU (Sysmex, 2022). Posteriormente, os tubos de urina são inseridos no aparelho AUTOPLAK (Beckman Coulter) que procede à realização automatizada da sementeira da urina para os meios adequados que são a Gelose de Sangue (GS) e Agar de Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED).

Tabela 7: Processamento de amostras de urina (¹(Becton Dickinson GmbH, 2013e); ²(Becton Dickinson GmbH, 2012))

Exame	Não se aplica		
Microscópico			
Exame Cultural	Processamento	Ansa de 1 µL	
	Meios de Cultura	GS: meio bastante nutritivo de uso geral destinado ao isolamento e cultura de microrganismos não exigentes e exigentes ¹	CLED: meio que suporta o crescimento de agentes patogénicos e contaminantes urinários, porém evita o <i>swarming</i> (proliferação) de espécies de <i>Proteus</i> devido à ausência de eletrólitos ²
	Incubação	18 a 24h a 37°C e 5% CO ₂	

A interpretação semi-quantitativa das colónias bacterianas é feita a partir da cultura. As colónias são enumeradas e multiplicadas pelo fator de diluição x1000 para se obter as unidades formadoras de colónias (UFC) por mL. Assim, inferior a 10 colónias corresponde a $<10^4$ UFC/mL, 10-100 colónias correspondem a 10^4 - 10^5 UFC/mL, e >100 corresponde a $>10^5$ UFC/mL (Fonseca et al., 2004).

Tabela 8: Procedimento de identificação tendo em conta a interpretação semi-quantitativa das uroculturas

	Número de espécies bacterianas	Resultado e Procedimento
Sem crescimento após 18 a 24h	0	Cultura Negativa
Crescimento $>10^5$ UFC/mL	1 (colónias idênticas)	Identificação e TSA
	2	Repicagem para GS caso seja coco Gram-positivo (CGP)/Repicagem para CLED caso seja bacilo Gram-negativo (BGN)
	≥ 2	Flora mista/contaminação; Rejeita-se a amostra e sugere-se nova colheita
Crescimento entre 10^4-10^5 UFC/mL	1	(só se cultura for pura) Identificação e TSA
	≥ 2	Flora mista/contaminação; Rejeita-se a amostra e sugere-se nova colheita
Crescimento $< 10^4$ UFC/mL	1 ou ≥ 2	Flora mista/contaminação; Rejeita-se a amostra e sugere-se nova colheita

O agente etiológico mais frequentemente associado a ITUs é *Escherichia coli*, no entanto outras bactérias são frequentemente isoladas, como *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, outras *Enterobacteriaceae* e *Citrobacter spp.* (Correia et al., 2007).

Quanto a infeções urinárias causadas por bactérias Gram-positivas, tem-se o *Staphylococcus saprophyticus* como agente responsável por este tipo de infeção nas mulheres jovens e sexualmente ativas (Cristino, 2000). Outros cocos Gram-positivos são *Staphylococcus aureus*, agentes de infeções adquiridas tanto na comunidade como no meio hospitalar e também *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Tille, 2017k).

Sangue

O sangue é um dos produtos biológicos recebidos no laboratório de Microbiologia do SPC, sendo importante no diagnóstico de infeções. Como o sangue é um produto estéril, o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente indicativo do agente etiológico responsável pela infeção.

A bacteriemia pode ser detetada através da realização de uma hemocultura e define-se pela presença de bactérias no sangue (Serrano et al., 2019).

A hemocultura é uma prova analítica em que uma amostra de sangue é incubada num frasco com meio de cultura que promove o crescimento de microrganismos, para determinar a existência destes na corrente sanguínea do doente. A colheita é realizada por punção venosa de qualquer veia periférica. Devem ser colhidas duas a três amostras de sangue em locais anatómicos diferentes isto porque apenas uma hemocultura pode não ser suficiente para diagnosticar uma bacteriemia intermitente. O volume de sangue é crítico porque a concentração dos microrganismos é baixa na maioria das bacteriemias, principalmente se o doente estiver sob terapêutica antibiótica. No entanto, para as crianças são necessários menores volumes de sangue (1 a 5 mL), pois a concentração dos microrganismos durante o período de bacteriemia é muito mais alta do que nos adultos (volume recomendado: 10 a 30 mL) (Fonseca et al., 2004). As hemoculturas são importantes também no diagnóstico de sépsis, definida pela disfunção de órgãos causada por uma resposta não regulada do doente face a uma infeção (Serrano et al., 2019).

As amostras são processadas num sistema automático, BacT/ALERT® 3D, a 37°C no mínimo durante cinco dias (Previsdomini et al., 2012). Este equipamento utiliza uma tecnologia colorimétrica, sendo que cada frasco de hemocultura possui um sensor de CO₂, que é separado do meio de cultura por uma membrana semipermeável. Esta membrana é sensível às mudanças de pH causadas pela produção de CO₂ pelos microrganismos (CO₂ difunde-se através da membrana para o sensor, dissolve-se em água e gera iões de hidrogénio, fazendo diminuir o pH), mudando visivelmente de cor cinza para uma coloração mais amarela. Durante este tempo de incubação, as hemoculturas ficam sujeitas a leituras periódicas e a uma verificação diária dos resultados (Thorpe et al., 1990).

Tabela 9: Procedimento laboratorial associado ao processamento de hemoculturas no BacT/ALERT® 3D

Frasco de Hemocultura sem detecção de crescimento ao fim de 5 dias de incubação	Cultura negativa		
Frasco de Hemocultura com detecção de crescimento durante o período de 5 dias de incubação	Exame microscópico (Coloração de Gram)		
	Exame Cultural	Meio de cultura	GS
		Incubação	24 a 48h a 37°C e 5% CO ₂

Tabela 10: Procedimento aplicado após repicagem de frascos de hemocultura positivos (¹(bioMérieux, 2022); ²(Becton Dickinson GmbH, 2013a))

Cultura Negativa	Repicagem para PolyViteX (PVX) (meio nutritivo que se destina particularmente ao crescimento das bactérias mais exigentes) a partir do frasco de hemocultura e incubar novamente 24 a 48h a 37°C, se suspeita de microrganismo fastidioso ¹	
Cultura Positiva	1 espécie bacteriana	Identificação e TSA
	2 espécies bacterianas	Identificação e repicagem para CLED caso seja BGN ou CNA (Agar de Columbia Colistina + Ácido Nalidíxico com sangue de ovelha a 5%- meio selectivo utilizado para o isolamento de bactérias gram-positivas) caso seja CGP ²

As bactérias mais comumente identificadas nas hemoculturas positivas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Pseudomonas spp.* (Previsdomini et al., 2012; Serrano et al., 2019).

Fezes

Existe uma microbiota normal composta por diversos microrganismos no trato gastrointestinal. Por esta razão, as fezes são um produto biológico com abundância de microrganismos, e torna-se difícil o isolamento do agente que causa a infeção (Levinson, 2011b). Por isso, são utilizados meios seletivos para favorecer o crescimento das bactérias patogénicas em detrimento de outras.

As infeções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral (Fonseca et al., 2004). A diarreia é o sintoma clínico mais frequente, sendo causada pelos agentes etiológicos que se transmitem pela via fecal-oral, através de alimentos ou águas contaminadas (Hewison et al., 2012).

O exame às fezes envolve o exame macroscópico, ou seja, observar o aspeto e consistência da amostra (fezes diarreicas ou moldadas; sanguinolentas, com muco ou

aquosas) e a coprocultura é efetuada em vários meios seletivos. O exame cultural de rotina de fezes, no laboratório de Microbiologia do SPC, envolve a pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, no qual as amostras são inoculadas nos meios Hektoen, Ágar Salmonella Shigella (SS) e no caldo de bacilos Gram-negativos (BGN). Este último é um meio líquido de enriquecimento para recuperação dos microrganismos *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* (desfavorecendo o crescimento de espécies que não fermentam manitol, como *Proteus*), que necessita de ser repicado para os meios sólidos Hektoen e SS após 18 horas de incubação do caldo BGN (Tille, 2017). Procede-se à incubação destes meios sólidos a 37°C durante 18 a 24h, em atmosfera normal. A lactose, um dos constituintes destes meios, permite diferenciar as bactérias fermentadoras e não fermentadoras deste composto e, estes dois géneros não fermentam lactose (colónias incolores). Faz parte da constituição do meio SS o tiosulfato de sódio (também presente no meio Hektoen) e o citrato férrico que permite a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio por parte da *Salmonella spp.* (colónia incolor com centro preto), diferenciando-a da *Shigella spp (incolor)* (Becton Dickinson GmbH, 2013c, 2013d).

Outros microrganismos pesquisados por rotina são *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*, utilizando-se os meios seletivos CIN (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina) e CAM, respetivamente (Becton Dickinson GmbH, 2019; Becton Dickson GmbH, 2013). O meio para isolar *Yersinia spp.* é incubado numa atmosfera aeróbia a uma temperatura de 37°C durante 24h a 48h. O meio para isolamento de *Campylobacter spp.*, é incubado a 42°C, entre 48h a 72h em atmosfera de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, e 85% N₂) (Fonseca et al., 2004). Se forem observados nas culturas estes microrganismos prossegue-se à identificação dos mesmos.

Também se pesquisam toxinas produzidas por bactérias, por exemplo a toxina A e/ou toxina B produzida por *Clostridium difficile*, através de métodos de biologia molecular. O gene codificante destas toxinas é pesquisado com o auxílio do GeneXpert (Gateau et al., 2018).

O procedimento de outros produtos biológicos encontra-se esquematizado na seguinte tabela (Tabela 11).

Tabela 11: Procedimento laboratorial para LCR, Exsudados (vaginais p.ex.), Respiratórios (Expetoração, Aspirados e Lavados Brônquicos) ¹(Liofilchem, 2006; Tille, 2017); ²(Becton Dickinson GmbH, 2006); ³(Tille, 2017); ⁴(Becton Dickinson GmbH, 2013b)

	Exame Macroscópico	Exame Microscópico	Exame Cultural	
LCR	Amostra Turva/ Hemática	Esfregaço para Coloração de	Meios Cultura	Incubação
			GS; PVX; Brain Heart	24 a 72 horas a 37°C

		Gram	Infusion (BHI): meio nutritivo usado para cultivar organismos fastidiosos ¹	em atmosfera aerofílica	
Líquidos	Amostra Turva/Purulenta	Esfregaço para Coloração de Gram	Meios Cultura		Incubação
			Pleural e Sinovial	Peritoneal	24h a 48h a 37°C
			GS; PVX; BHI	GS; Cooked Meat (CM): meio de enriquecimento para recuperação de anaeróbios ²	
Exsudados (Vaginais, Uretrais e Retais)	Não Aplicável	Exame direto a fresco; Esfregaço para Coloração de Gram	Meios Cultura		Incubação
			GS; CNA; VCAT (Vancomicina, Colistina, Anfotericina e Trimetoprim): meio para isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> ³		24h a 48h a 37°C
Respiratórios (Expetoração, Aspirado brônquico e Lavado bronco-alveolar)	Não Aplicável	Esfregaço para Coloração de Gram	Meios Cultura		Incubação
			GS; PVX; HAE: meio para isolamento de <i>Haemophilus</i> spp. ⁴ ; Gelose Sabouraud: meio para isolamento de leveduras e fungos; Agar seletivo <i>Burkholderia cepacia</i>: meio seletivo para recuperação de <i>B. cepacia</i> de doentes com fibrose quística ³		24 a 48h a 37C em atmosfera 5% de CO ₂

5.1.3. Metodologias de identificação em bacteriologia

Após os resultados preliminares obtidos no exame direto é feita a identificação dos microrganismos, ou seja, a interpretação visual das primoculturas após 18 a 24h de incubação. Com isto, correlaciona-se o crescimento bacteriano, quer seja em meio sólido ou líquido, com os resultados diretos observados em esfregaços corados pelo

método de Gram obtidos anteriormente. Esta avaliação do crescimento bacteriano possibilita uma maior rapidez a nível de diagnóstico e consequente adequação da terapêutica do doente (Tille, 2017).

A caracterização da morfologia das colónias tem em conta vários parâmetros como: tamanho; pigmentação; forma (inclui forma, elevação e margem da colónia); aparência da superfície (brilhante, opaca, seca, transparente); odor e alterações nos meios de cultura como consequência do crescimento bacteriano como por exemplo pelo padrão hemolítico (alfa ou beta hemólise). No entanto, não é suficiente apenas avaliar a morfologia da colónia para se fazer uma correta identificação, isto porque bactérias da mesma espécie exibem diversidade morfológica (Figura 21) (Tille, 2017).

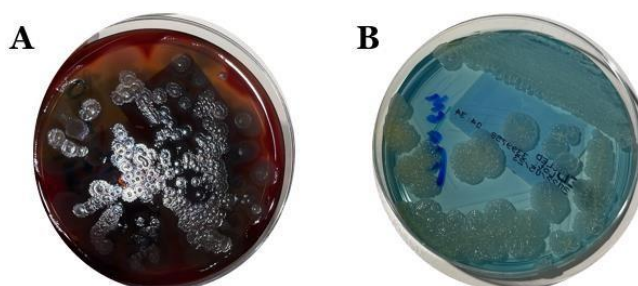


Figura 21: Placas de cultura com crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (meio de GS) em A e *Klebsiella pneumoniae* (meio CLED) em B (SPC, CHUC 2022)

Espectrometria de massa (MS): Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight Mode (MALDI-TOF)

No laboratório de Microbiologia do SPC aplica-se a metodologia *MALDI-TOF-matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight* baseada na espectrometria de massa para identificação microbiana, com o auxílio do MALDI-TOF Biotyper® (Bruker). O procedimento prático é feito a partir de uma colónia pura do microrganismo que se quer identificar, é aplicada a amostra com uma ansa numa lâmina metálica, sendo posteriormente aplicada uma matriz a essa lâmina (Figura 22). Esta matriz desempenha um papel fundamental porque absorve a energia da luz do laser e indiretamente faz com que o analito evapore. É importante a solução secar e o resultado é então a cristalização das proteínas da amostra. A lâmina é colocada no aparelho, num ambiente de vácuo elevado e é disparado um raio laser UV que ioniza a amostra e o processo de ionização origina pequenas moléculas que passam através de um tubo de vácuo até entrarem em contacto com o detetor do espectrómetro de massa (Jang et al., 2018).

O princípio fundamental desta metodologia assenta no seguinte: moléculas com diferentes massas e cargas migram com diferentes velocidades, o que se vai refletir no tempo de voo, que é registado para cada proteína. Cada uma destas vai gerar um sinal

distinto e tendo em conta que todos os microrganismos possuem um conjunto espectral único, existe um algoritmo neste sistema que lê cada espectro, originando uma série de picos para se proceder a uma análise e comparação numa base de dados (Figura 22). A identificação do microrganismo é feita ao nível do género e espécie e uma vantagem desta identificação automatizada é ser bastante rápida (Wattal et al., 2017).

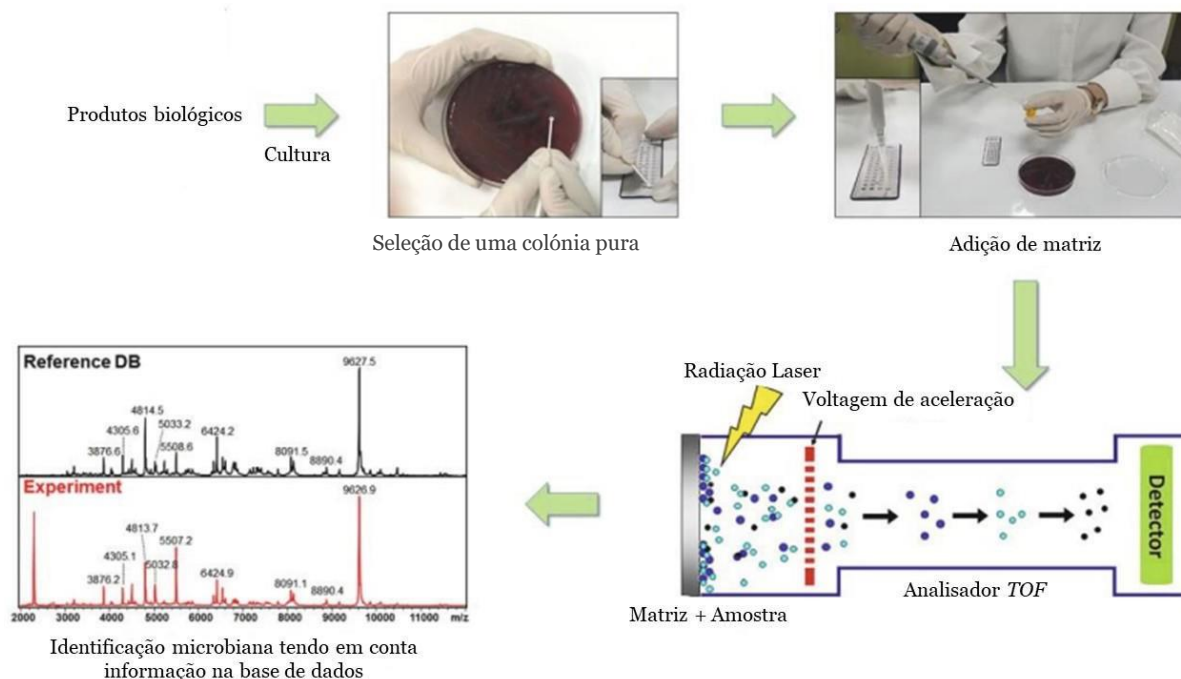


Figura 22: Identificação microbiana através da tecnologia *MALDI-TOF* (Adaptado de (Jang et al., 2018))

Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Após a identificação dos organismos presentes nas amostras biológicas, segue-se a realização do teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), com o objetivo de determinar qual a antibioterapia mais adequada à infeção. Assim, este teste é importante para que a terapêutica seja eficaz no tratamento de infeções causadas por esses microrganismos (Tille, 2017d).

O resultado dos testes de suscetibilidade pode-se traduzir em sensível (microrganismo responde à terapêutica com o antimicrobiano utilizando a dosagem normalmente recomendada), intermédio (alta probabilidade de sucesso terapêutico porque a exposição ao antimicrobiano é aumentada pelo ajuste do regime de dosagem ou pela sua concentração no local da infeção) ou resistente (improvável uma boa resposta terapêutica mesmo quando aumentadas as concentrações do antimicrobiano e/ou está presente um mecanismo de resistência intrínseca) (Brown et al., 2011; Fonseca et al., 2004). Estes resultados são também expressos pela concentração

mínima inibitória (CMI). A CMI define-se como sendo a menor quantidade de antibiótico que é necessária para inibir o crescimento do inóculo *in vitro*, e desta forma, consegue-se estimar a quantidade de fármaco necessária para inibir o crescimento *in vivo* do microrganismo (Tille, 2017d).

Atualmente no laboratório de Microbiologia do SPC, o TSA é realizado pelo aparelho automatizado MicroScan WalkAway (Beckman Coulter), à exceção de alguns microrganismos para os quais é realizado um TSA manual. Este sistema procede à incubação da suspensão bacteriana e tem disponíveis painéis com concentrações predefinidas de antibióticos, tendo em conta a espécie microbiana, sendo que essa suspensão é inoculada nos poços de cada painel e estes são lidos pelo aparelho. O crescimento bacteriano é detetado por espectrofotometria (Tille, 2017d).

A interpretação e validação dos resultados são feitas com base nas normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). No caso de microrganismos e antibióticos ainda não estudados por este Comité pode-se consultar as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou consultar artigos científicos.

5.2. Micobacteriologia

As micobactérias compreendem o género *Mycobacterium*. Trata-se de bactérias aeróbias, imóveis, não capsuladas e não formadoras de esporos. A parede celular é extremamente rica em lípidos, tendo caracteristicamente ácidos micólicos com cadeias longas e ramificadas, o que torna a superfície hidrofóbica e confere a estas bactérias propriedades importantes. Uma vez coradas, resistem à descoloração por soluções ácido-alcoólicas, sendo-lhes por isso atribuída a designação de bactérias ácido-álcool-resistentes (BAAR) (J. P. C. de Sousa et al., 2000).

O grupo que compreende os patogénios estritos diz respeito a *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, sendo estas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MT) e *M. leprae* (Bento et al., 2011). Um segundo grupo a considerar são as micobactérias potencialmente patogénicas, podendo causar doença e exemplo disso é o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*. Este complexo compreende bactérias que causam infeções oportunistas em doentes imunocomprometidos (J. P. C. de Sousa et al., 2000).

A fim de controlar a infeciosidade da tuberculose (TB) é imperativo um diagnóstico precoce para dar início ao tratamento adequado. O exame de referência

para diagnosticar TB é o isolamento do MT em exame cultural (Bento et al., 2011). No entanto, também pode ser feito o diagnóstico de forma mais célere, com o auxílio do GeneXpert® (Stevens et al., 2017).

A maioria das amostras biológicas enviadas ao laboratório para confirmação cultural de suspeita de infeção por micobactérias (expetoração, lavados bronco-alveolares, aspirados brônquicos, urina e fezes) são amostras que se encontram contaminadas por flora comensal. Para maximizar o crescimento das micobactérias, estes produtos biológicos contaminados necessitam de um tratamento: homogeneização e descontaminação. No processo de descontaminação é utilizada uma solução de N-acetil-L-cisteína (NALC), citrato de sódio e NaOH. É adicionado tampão fosfato para neutralizar a reação e logo depois a solução é sujeita a centrifugação (15min a 3000xg) para concentrar a amostra. O sedimento resultante da centrifugação é então utilizado para inocular os meios de cultura e realizar o esfregaço para coloração de Ziehl-Neelsen modificada (Tille, 2017e).

A amostra de fezes, pela presença de muitos microrganismos, torna difícil o processo de descontaminação, por isso, este tipo de amostras é sujeito a um pré-tratamento antes da descontaminação (Tille, 2017e). É realizada uma suspensão com fezes e água destilada, a qual é filtrada com uma gaze. Em seguida, a solução obtida prossegue para a descontaminação, tal como descrita anteriormente.

As amostras de sangue colhidas para frascos de hemoculturas são inseridas diretamente no aparelho BACTEC™ 9120™. Estas garrafas de hemocultura contêm um meio de cultura não seletivo, o BHI, e meio *Middlebrook*. No fundo de cada garrafa existe um sensor de fluorescência sensível à concentração de CO₂, sendo o princípio o mesmo descrito para o BACTEC™ 960™.

Exame Microscópico

No exame microscópico é possível distinguir as micobactérias das outras bactérias e células. Este exame é realizado através do esfregaço feito em lâmina e corada por Ziehl-Neelsen. A modificação desta técnica de coloração, em relação à coloração convencional, consiste na substituição do fenol (citotóxico e carcinogénico) por um detergente orgânico líquido concentrado (Clarke et al., 1996). Esta técnica baseia-se na coloração pela fucsina básica que confere aos BAAR uma cor avermelhada após lavagem por álcool-ácido. Após lavagem é usado um segundo corante, azul de metileno, que cora de azul outros microrganismos, células e detritos celulares (Tille, 2017e). Segundo a OMS, a definição de caso de tuberculose a partir de um exame direto

positivo baseia-se na presença de pelo menos um BAAR, em pelo menos uma amostra de expetoração (Bento et al., 2011).

Exame Cultural

Quanto ao exame cultural, que é realizado depois do processamento inicial da amostra, diz respeito à utilização de diferentes meios de cultura com o objetivo de otimizar a recuperação de micobactérias: um meio de cultura sólido e um líquido. O meio de cultura sólido que é utilizado no laboratório do SPC é o meio de Löwenstein-Jensen (L-J) e a amostra inoculada no meio é incubada a 37°C, durante 6 semanas (período que corresponde ao crescimento lento característico das micobactérias). Com este meio é possível fazer-se uma determinação quantitativa, através da contagem do número de colónias, o que o torna o mais adequado para a monitorização do tratamento e a avaliação macroscópica do aspeto morfológico das colónias é feita uma vez por semana. O meio líquido é o meio *Middlebrook* (MGIT) e, sendo um meio mais enriquecido, será mais sensível (Bento et al., 2011). É constituído por um caldo nutritivo *Middlebrook* 7H9, que favorece o crescimento das micobactérias, suplementado com uma mistura de antibióticos composta por polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina (PANTA). Esta solução PANTA inibe o crescimento dos microrganismos da microbiota normal (Becton Dickinson GmbH, 2016). A amostra (inoculada no meio MGIT) é incubada a 37°C no equipamento BACTEC™ MGIT™ 960, um sistema automático que monitoriza o crescimento micobacteriano, baseado num método fluorimétrico. O tubo do meio MGIT contém um composto fluorescente sensível à alteração da concentração de O₂. Assim, quando há crescimento bacteriano, existe consumo de O₂, e conseqüentemente o sensor emite fluorescência. Assim, este equipamento identifica as culturas positivas através da deteção de fluorescência (Bento et al., 2011). Depois de 6 semanas de incubação, se os meios de cultura não apresentarem crescimento de micobactérias, a amostra é reportada como negativa. As culturas positivas do meio MGIT são confirmadas com um esfregaço para coloração de Ziehl-Neelsen e também são inoculadas num meio GS, a fim de perceber se a positividade não é devida a um contaminante.

Através de métodos de biologia molecular no laboratório do SPC a identificação de micobactérias pode ser feita com o auxílio do kit FluoroLyse® (Bielsa et al., 2021).

Quando uma cultura é positiva para micobactérias importa identificar a espécie em causa. Atualmente, existem técnicas que permitem detetar, diretamente da amostra com exame direto positivo, as mutações mais frequentes associadas a resistência à

isoniazida e/ou rifampicina, através de amplificação e hibridização com sondas específicas (Bento et al., 2011).

TSA para Micobactérias

A realização do TSA é fundamental na decisão terapêutica, sendo este teste de sensibilidade importante para o tratamento eficaz e adequado de doentes com tuberculose. A tuberculose multirresistente é uma ameaça enorme à saúde pública, apresentando resistência à rifampicina e à isoniazida, os dois fármacos mais usados como tratamento eficaz contra a tuberculose (Bento et al., 2011). O tratamento da tuberculose é frequentemente realizado através de um regime com vários fármacos, os anti-micobacterianos de 1^a linha, que incluem a Streptomina, a Isoniazida, a Rifampicina e Etambutol (SIRE) e ainda a Pirazinamida (PZA) (Programa Nacional para a Tuberculose, 2020).

A Direção Geral de Saúde (DGS) preconiza a realização de testes de sensibilidade aos antibacilares de 1^a linha em todos os novos casos de isolamento de *MT complex*, tal como nos retratamentos. Estes testes devem igualmente ser repetidos se um doente mantiver culturas positivas, ao fim de três meses de tratamento, ou desenvolver culturas positivas após um intervalo de tempo com exames culturais negativos (Bento et al., 2011).

O TSA para micobactérias é realizado no equipamento BACTEC™ MGIT™ 960. Este aparelho monitoriza constantemente a fluorescência emitida por cada tubo, sendo os resultados de sensibilidade determinados pela comparação da fluorescência emitida pelos tubos que contêm fármaco em relação aos tubos de controlo de crescimento (sem fármaco) (Bento et al., 2011; Tille, 2017e). Os resultados são, finalmente, interpretados automaticamente e reportados como sensível ou resistente.

5.3. Micologia

Os fungos são classificados em leveduras, fungos filamentosos e dimórficos. O dimorfismo consiste na manifestação da forma leveduriforme ou filamentosa, consoante a temperatura for de 37°C ou de 25°C, respetivamente (Tille, 2017f).

Sabe-se que o número de infeções fúngicas tanto hospitalares como as adquiridas na comunidade têm vindo a aumentar de forma acentuada e a principal causa deste aumento é o número cada vez maior de doentes imunocomprometidos. E,

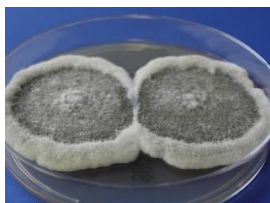
microrganismos oportunistas (microrganismos que normalmente não são patogénicos) infetam hospedeiros imunocomprometidos (Tille, 2017f).

O diagnóstico laboratorial de infeções fúngicas implica o isolamento e a identificação do fungo responsável por esta condição clínica. Muitas das infeções fúngicas têm o seu foco principal nos pulmões e são frequentemente usadas amostras do trato respiratório para diagnóstico, embora também possa ocorrer a disseminação da infeção para locais distantes de onde se encontra o organismo, podendo este ser recuperado de locais não respiratórios (Tille, 2017f).

As condições em que se incubam as culturas dependem da amostra biológica em questão e a incubação é feita a 30°C numa estufa com humidade, mas em caso de suspeita de dermatófitos o meio de cultura é incubado a 25°C. O tempo de incubação é variável porque a maioria dos fungos tem crescimento lento e, por essa razão, a duração varia consoante o tipo de fungo em estudo (Freitas, 2000). As amostras biológicas são inoculadas em Gelose Sabouraud (com cloranfenicol para impedir o desenvolvimento bacteriano), pois este meio é específico e utilizado essencialmente para o isolamento e cultura de fungos (Becton Dickinson GmbH, 2009; Freitas, 2000; Tille, 2017f).

Após o tempo de incubação é feita a identificação do fungo tendo por base a observação macroscópica e microscópica das colónias. Na observação macroscópica das colónias, deve-se valorizar a textura, pigmentação, taxa de crescimento (lento ou rápido) e forma (Freitas, 2000). Para a observação microscópica, com o auxílio de uma ansa, é colocada uma porção da colónia numa lamela, com uma gota de azul de lactofenol, sendo que esta coloração irá permitir a preservação das estruturas e a observação dos esporos e das hifas (Tille, 2017f). No entanto, esta identificação do fungo isolado nem sempre pode corresponder ao agente que causa a patogenicidade, pode ser um microrganismo da microbiota normal ou um contaminante. Assim, é importante interpretar os resultados obtidos tendo sempre em conta a informação clínica do doente.

Alternaria alternata
(Colónia com 9 dias de incubação)



Aspergillus clavatus
(Colónia com 4 dias de incubação)



Scedosporium
(Colónia com 9 dias de incubação)



Figura 23: Observação macroscópica de colónias de fungos (SPC, 2022)

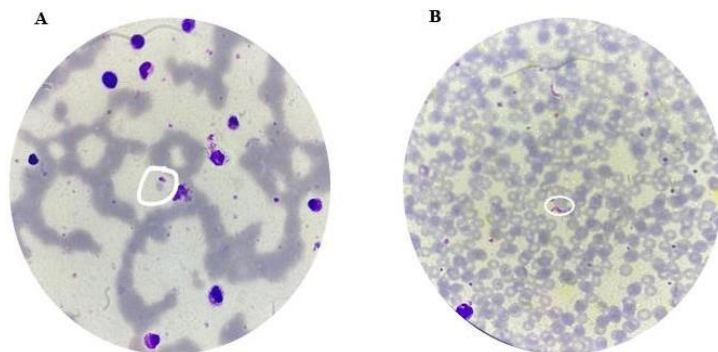
5.4. Parasitologia

O ramo da parasitologia é frequentemente associado a áreas tropicais, porque as doenças tropicais são mais prevalentes nessas regiões geográficas. No entanto, muitos parasitas com a capacidade de infetar seres humanos distribuem-se mundialmente, até em zonas temperadas. As alterações climáticas e o aumento das viagens contribuem para esta distribuição mundial (Tille, 2017h). É importante entender o ciclo de vida dos parasitas, tanto para implementar medidas preventivas, como para perceber a progressão da doença em hospedeiros normais e imunocomprometidos.

No subsetor de parasitologia, do laboratório do SPC, as amostras predominantes para análise parasitológica são fezes e sangue.

Para o exame parasitológico recomenda-se uma colheita de três amostras fecais em dias alternados. O exame parasitológico das fezes inclui o exame macroscópico e microscópico da amostra. Quanto ao primeiro, observa-se o aspeto das fezes: textura, cor e presença de sangue ou muco. O exame microscópico envolve o processamento da amostra através do kit comercial ParasiTrap®, usando um método de concentração (método de Ritchie modificado), de maneira a aumentar a probabilidade de serem visualizados quistos, ovos, larvas e ainda trofozoítos (Mirante et al., 2016). O sedimento que se obtém por esta técnica de concentração é observado ao microscópio utilizando as objetivas de 10x na pesquisa de larvas e ovos, e a objetiva de 40x na identificação de quistos ou trofozoítos.

As infeções parasitárias podem ser provocadas por *Plasmodium spp*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*; *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* e também por helmintas (Fritsche et al., 2011) (Figura 24).



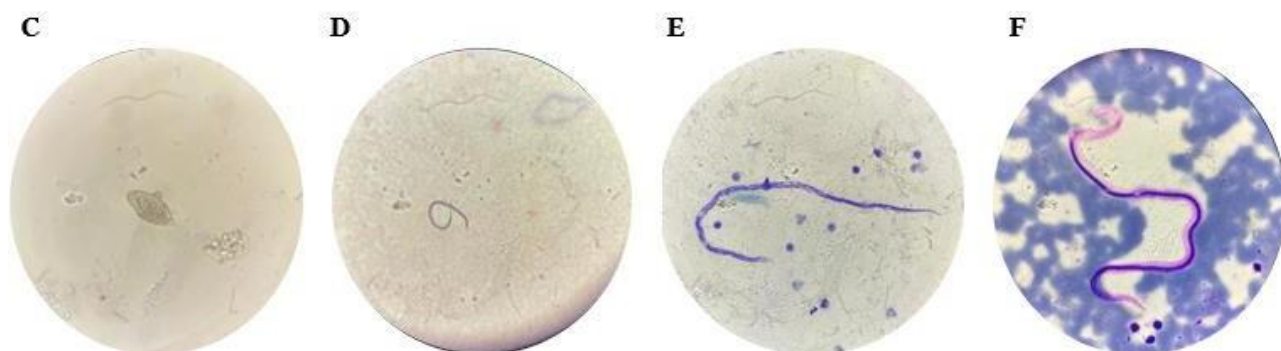


Figura 24: A – *Leishmania* (50x) ; B – *Trypanosoma cruzi* (100x); C – *Schistosoma haematobium* (40x); D – *Loa Loa* (50x); E – *Brugia malayi* (100x); F – *Wuchereria bancrofti* (100x) (SPC, 2022)

A malária é uma infeção provocada por espécies de *Plasmodium spp.*, nomeadamente *Plasmodium vivax*, *P.falciparum*, *P.malariae*, *P.ovale* e *P. knowlesi* (Figura 25). Quanto ao diagnóstico laboratorial são feitas lâminas do esfregaço de sangue periférico e da gota espessa e coradas pela coloração de Giemsa. Na gota espessa há um aumento da sensibilidade aquando da deteção do parasita (maior quantidade de sangue numa pequena área). Contudo, no esfregaço sanguíneo, a amostra está íntegra e há fixação dos eritrócitos (ao contrário da gota espessa que lisa os eritrócitos), permitindo um melhor estudo da morfologia do parasita e das alterações características do eritrócito parasitado. Consequentemente, é mais fácil a identificação da espécie de *Plasmodium spp* (Fritsche et al., 2011). Além desta análise, realizam-se testes imunocromatográficos para a deteção de antígenos de *Plasmodium spp*. A deteção de antígenos do parasita fornece um marcador da presença de infeção (CDC, 2022).

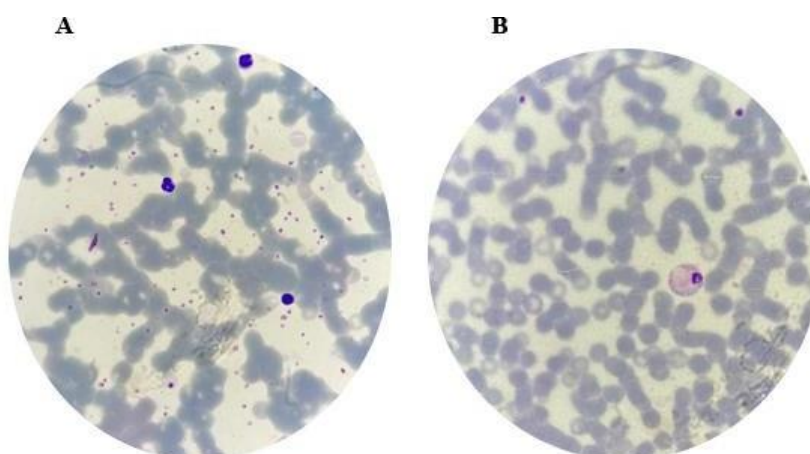


Figura 25: A - *Plasmodium falciparum* (gametócito) (50x); B – *Plasmodium ovale* (50x). (SPC, 2022)

5.5. Serologia

A serologia diz respeito ao diagnóstico de doença infecciosa através da medição dos níveis de anticorpos no soro. Envolve o estudo das reações entre antigénio e anticorpo no soro, permitindo avaliar o nível de imunidade do hospedeiro (Tille, 2017g).

Em resposta aos antigénios característicos de um determinado agente infeccioso são produzidos anticorpos, ou seja, há uma resposta imune humoral. Os primeiros anticorpos a surgirem são as imunoglobulinas M (IgM), e só posteriormente surgem as imunoglobulinas G (IgG). Assim sendo, a presença de IgM no soro sugere uma infeção aguda (fase em que a doença infecciosa é diagnosticada pela primeira vez ou há suspeita dela), ou seja, infeção recente, contrariamente à presença de IgG no soro que é sugestivo de uma infeção passada (Tille, 2017g).

O estudo da cinética de anticorpos implica haver um intervalo de 2 a 3 semanas na colheita que é feita ao doente. Através da alteração no título de anticorpos (equivalente à maior diluição do soro do doente no qual o anticorpo ainda é detetável) é possível monitorizar e interpretar a evolução da doença (Tille, 2017g).

A determinação do Índice de Avidéz é um teste complementar à pesquisa de anticorpos da classe IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii*. Após a deteção de anticorpos da classe IgG e IgM, este índice ajuda a excluir a hipótese de infeção recente, com menos de 4 meses. Este teste permite a distinção dos anticorpos de avidéz fraca (mais recentes), de anticorpos de avidéz forte (mais antigos), uma vez que esta aumenta ao longo do tempo, após primo-infeção. O princípio do doseamento associa o método imunoenzimático *sandwich* em duas etapas com uma deteção final em fluorescência, isto é, na presença de anticorpos na amostra, estes ligam-se ao antigénio específico adsorvido num cone (fase sólida), formando o complexo Antigénio-Anticorpo (Laboratório SPC CHUC, 2022).

No laboratório do SPC, na Serologia, são realizadas várias análises serológicas, que se encontram parametrizadas no Anexo IV. Também se realizam algumas técnicas manuais, descritas na seguinte tabela.

Tabela 12: Técnicas manuais realizadas no subsetor de Serologia do SPC ¹(Pessegueiro et al., 2003), ²(Laboratories, 2019))

TÉCNICAS MANUAIS
Rosa de Bengala Consiste na reação de aglutinação em placa, entre a amostra em estudo e uma suspensão tamponada de <i>Brucella abortus</i> 99 (<i>Weybridge</i>), inativada pelo calor e pelo Fenol e corada por Rosa de Bengala. A

positividade do resultado é atribuída em função da aglutinação observada. ¹ Pesquisam-se anticorpos anti-*Brucella spp.*

RPR

Prova de aglutinação em placa que deteta reaginas (teste não treponémico). O anticorpo (reagina) liga-se ao antigénio que é composto por um complexo de partículas de cardiolipina, lecitina e colesterol com carvão ativado. Se houver reação anticorpo-antigénio revela-se uma aglutinação, sendo a positividade atribuída em função da maior diluição em que esta se verifica.

É o segundo teste a ser feito depois do sífilis *screening* ser positivo (isto é, quando o anticorpo anti-*Treponema pallidum* é positivo).²

TPPA

É utilizada uma suspensão de partículas de gelatina sensibilizadas com antigénio purificado de *Treponema pallidum*. Princípio do teste: Partículas sensibilizadas são aglutinadas pela presença de anticorpos anti-*Treponema pallidum* na amostra. A positividade é atribuída em função da maior diluição em que se verifica a aglutinação. É realizado caso o RPR seja negativo.²

Durante o meu estágio na serologia tive a oportunidade de acompanhar um estudo que foi desenvolvido por uma equipa multidisciplinar de profissionais do SPC do CHUC. O estudo baseia-se na resposta imune celular (mediada por linfócitos T) e mediada por anticorpos à vacina contra a Covid-19, ao longo do tempo e foi aceite para publicação.

O que se concluiu do estudo é que depois de ser administrada uma dose da vacina aos indivíduos recuperados da infeção, verificou-se um aumento significativo dos níveis de anticorpos IgG e IgA, e de linfócitos T específicos para SARS-CoV-2. No entanto, 8 dos 50 participantes recuperados da infeção, não apresentavam linfócitos T específicos para este vírus (sete deles desenvolveram-nos após a vacina). A importância deste dado deve-se ao facto de estar demonstrado que, em outros coronavírus, são os linfócitos T que asseguram a imunidade a longo prazo, desconhecendo-se, ainda, se esta circunstância também é válida para o SARS-CoV-2 (Laranjeira et al., 2022).

6. Setor de Bioquímica

A bioquímica é a ciência que estuda as reações químicas que ocorrem nos seres vivos (Berg et al., 2015). É fundamental na prática clínica porque ao fornecer informações sobre os processos metabólicos consegue-se perceber e identificar quando estes ocorrem associados a eventuais patologias. Desta forma, consegue-se dar apoio ao diagnóstico e monitorização de doentes (Baynes et al., 2014).

O setor de Bioquímica do SPC, sendo dos mais automatizados, encontra-se maioritariamente no core, e tem equipamentos que estão inseridos na cadeia. Neste setor, a maior parte das análises pedidas são efetuadas em amostras do soro, plasma e

urina, sendo utilizado o tubo do sangue total em EDTA (tubo hemograma) para a determinação da hemoglobina glicada (HbA1c). A grande maioria das amostras de soro são colhidas em tubos de gel. Também são rececionadas amostras de LCR e outros líquidos (pleural e peritoneal) para a determinação da glicose, LDH, cloro, lactato, pH, adenosina-desaminase (ADA), enzima conversora da angiotensina sérica (SACE) e proteínas totais.

Existe uma sala onde é efetuada a triagem e o tratamento de urinas, bem como a análise da sumária de urina e sumária com sedimento. É feita a pesquisa de sangue oculto nas fezes, análise de cálculos renais e outras análises pedidas com menos frequência, como o doseamento de metais pesados (cobre, zinco, alumínio) e fármacos. Como alguns destes parâmetros não são realizados todos os dias, isto porque se rentabiliza ao máximo os reagentes para um maior número possível de amostras, diminuindo também o tempo despendido para a realização destas análises, as amostras são alíquotadas para congelação, de forma a manter a sua viabilidade e integridade. Na Tabela 13 encontra-se a descrição dos equipamentos utilizados neste serviço para a determinação dos parâmetros bioquímicos e as respetivas metodologias.

Tabela 13: Equipamentos do Setor de Bioquímica e metodologias associadas

EQUIPAMENTO	TÉCNICAS/METODOLOGIAS
Alinity i (Abbott Diagnostics); Alinity c (Abbott Diagnostics) 	Quimioluminescência; Espectrofotometria e Turbidimetria
D-100 (Bio-Rad) 	Cromatografia líquida de alta eficiência por troca catiónica (HPLC)
Minicap (Sebia) 	Eletroforese Capilar (EC)
AutionMax (ARKRAY) 	Espectrofotometria de refletância

SediMax (ARKRAY)		Citometria de fluxo
SENTiFIT 270 (Sysmex)		Imunoquímica

6.1. Metodologias utilizadas no setor de Bioquímica

Neste setor são utilizados os equipamentos Alinity c para dosear os parâmetros das análises de bioquímica, com base nas metodologias já descritas anteriormente (espectrofotometria e turbidimetria). Os equipamentos Alinity i são também usados, e são um sistema de imunoensaio que maximiza a produtividade utilizando uma tecnologia de quimioluminescência (já descrita antes).

Além destas técnicas, utiliza-se a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) para a determinação da hemoglobina glicada A1c (HbA1c), no sistema automatizado D-100 (Bio-Rad).

6.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O princípio do ensaio realizado no equipamento D-100 é baseado na separação das frações de hemoglobina por HPLC de troca iónica (Jaisson et al., 2015). O HPLC é um tipo de cromatografia líquida que usa uma coluna que contém pequenas partículas na fase estacionária. Baseia-se na separação das moléculas de uma mistura com base na sua carga. No HPLC, os grupos funcionais da fase estacionária são polares em relação aos da fase móvel, que geralmente são solventes apolares (Ullman et al., 2008).

O analito de interesse, neste caso uma mistura de hemoglobinas em solução, sob uma pressão elevada, passa através da coluna cilíndrica que tem pequenas partículas esféricas (fase estacionária). A coluna (carregada positivamente) é então perfundida com um tampão (fase móvel) que varia continuamente em pH e força iónica (Sharma et al., 2016). Há retenção do(s) analito(s) na fase estacionária (carregada negativamente), através de ligações iónicas. Em resposta a um gradiente de força iónica crescente,

proporcionado pela fase móvel, ocorre a eluição dos componentes em tempos diferentes, consoante a carga, sendo a deteção por espectrofotometria feita a 415 nm e 690 nm (Sacks, 2008; Sharma et al., 2016).

É obtido um cromatograma que permite a identificação e quantificação do analito com base no tempo de retenção e na área do pico. O resultado da HbA1c é calculado a partir da razão HbA1c/(frações derivadas de HbA) e é expresso em mmol/mol e/ou em percentagem (%) (Jaisson et al., 2015).

6.1.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MSMS)

A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MSMS) é uma técnica que envolve a separação física de compostos-alvo (ou analitos) seguida da sua deteção por espectrometria de massa (Annesley et al., 2008).

Os parâmetros que são avaliados, no setor de Bioquímica, por esta metodologia são: doseamento de catecolaminas, doseamento de ácido vanilmandélico, metanefrinas fracionadas (plasma e urina), doseamento de vitamina A e E, doseamento de cistina e creatina na urina, ácido guanidinoacético, clozapina, colistina, isoniazida, imatinib/nilotinib, aminoácidos (plasma), ácidos orgânicos, doseamento de vitamina B1, B2 e B6, doseamento de vitamina C no soro, ácido metilmalónico (também na urina), antimicóticos (plasma) e metabolitos azatioprina (sangue) (SPC, 2022).

6.2. Parâmetros analisados

Eletrólitos e iões

Os eletrólitos participam na regulação do equilíbrio hídrico e do equilíbrio ácido-base no corpo. Geralmente são solicitados vários destes analitos em conjunto para avaliar o equilíbrio geral, tanto num contexto de ambientes de cuidados intensivos, bem como em ambientes de rotina. Existem condições nas quais o equilíbrio eletrolítico se encontra alterado, tais como edema, fraqueza, confusão, arritmias cardíacas, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, doença hepática e doença renal (Reed, 2016). De seguida, na Tabela 14 são apresentados os analitos quantificados no SPC e a razão de serem feitas as análises aos mesmos.

Tabela 14: Eletrólitos e iões - Analito e razão pela qual é quantificado

ANALITO	RAZÃO PELA QUAL É QUANTIFICADO
SÓDIO (NA⁺)	Principal catião extracelular responsável pela manutenção do equilíbrio hídrico na circulação; os níveis sanguíneos são controlados através da excreção e reabsorção pelos rins
POTÁSSIO (K⁺)	Principal catião intracelular responsável pela contração muscular e manutenção da frequência cardíaca normal
CLORO (CL⁻)	Principal anião extracelular; alterações de concentração normalmente refletem as concentrações de sódio
DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂)	Principal anião que estabiliza o sangue para pH fisiológico (7,4)
CÁLCIO (CA²⁺)	Frequentemente medido como um teste screening (de triagem), uma vez que este é rigidamente controlado e mantido numa estreita faixa de concentrações; valores alterados podem sinalizar uma ampla gama de problemas metabólicos
FOSFATO (PO₄⁻³)	Geralmente medido junto com outros analitos para ajudar a diagnosticar problemas com o metabolismo do cálcio
MAGNÉSIO (MG²⁺)	Frequentemente solicitado como um teste de follow-up (de acompanhamento) para níveis baixos de cálcio ou potássio ou para avaliar sintomas de problemas musculares como fraqueza, espasmos, cólicas ou arritmias cardíacas
FERRO (FE²⁺)	Usado principalmente para determinar se o doente tem deficiência de ferro ou para determinar se o doente tem uma síndrome de sobrecarga de ferro

Pequenas moléculas e metabolitos

Existem milhares de pequenas moléculas a serem formadas e destruídas em processos metabólicos todos os dias. Aquelas que circulam no sangue ou que são excretadas na urina podem ser utilizadas como indicadores que refletem o quão bem o corpo está a funcionar, isto é, se o doente está a usar e a armazenar energia de forma eficiente, a eliminar resíduos e se está saudável. Na rotina laboratorial são várias as moléculas que se quantificam, podendo ser divididas em: as que refletem o estado nutricional, as que refletem a eliminação de produtos residuais e aquelas que refletem o controlo metabólico (Reed, 2016) (Tabela 15).

Tabela 15: Pequenas moléculas e metabolitos - Analito e razão pela qual é quantificado

ANALITO	RAZÃO PELA QUAL É QUANTIFICADO
GLICOSE	Para diagnosticar diabetes (glicose elevada no sangue reflete deficiência de insulina ou resistência à insulina)
VITAMINA B12	Identifica uma deficiência quando os níveis de ferro e eritrócitos de grandes dimensões estão baixos (anemia macrocítica)
ÁCIDO FÓLICO	Quantificado conjuntamente com a vitamina B12 para determinar a causa da anemia macrocítica
BILIRRUBINA TOTAL	Para avaliar a função hepática
BILIRRUBINA DIRETA	Para testar a capacidade do fígado de conjugar a bilirrubina (forma conjugada é solúvel em água) e excretá-la
ÁCIDO ÚRICO	Para avaliar a inflamação articular que pode ser devido à gota; muitas vezes solicitado para monitorizar a produção de ácido úrico em doentes submetidos a quimioterapia ou radioterapia
CREATININA	Para avaliar a função renal e monitorizar a terapia para doença renal; a creatinina pode ser quantificada no sangue, na urina ou em ambos para avaliar a função renal
AZOTO UREICO	Frequentemente pedido com a creatinina para avaliar a função renal; também usado para monitorizar pacientes em diálise
AMÓNIA (NH₄⁺)	Para avaliar desorientação, confusão e coma em adultos; avaliar irritabilidade e convulsões em recém-nascidos

Proteínas

As proteínas são macromoléculas – polímeros que são formados a partir de aminoácidos essenciais. As proteínas que constituem o grupo com maior foco das análises de bioquímica são aquelas que estão presentes no plasma sanguíneo e são conhecidas como proteínas plasmáticas (Johnson, 2008). O grupo das proteínas inclui proteínas plasmáticas, proteínas de transporte, proteínas de defesa e proteínas de coagulação. A maioria é produzida pelo fígado, com exceção das imunoglobulinas (produzidas pelos linfócitos B). Outras proteínas às vezes encontradas no sangue são proteínas cuja função primária é desempenhada intracelularmente e a sua presença no sangue geralmente reflete dano celular (Reed, 2016) (Tabela 16).

Tabela 16: Proteínas - Analito e razão pela qual é quantificado

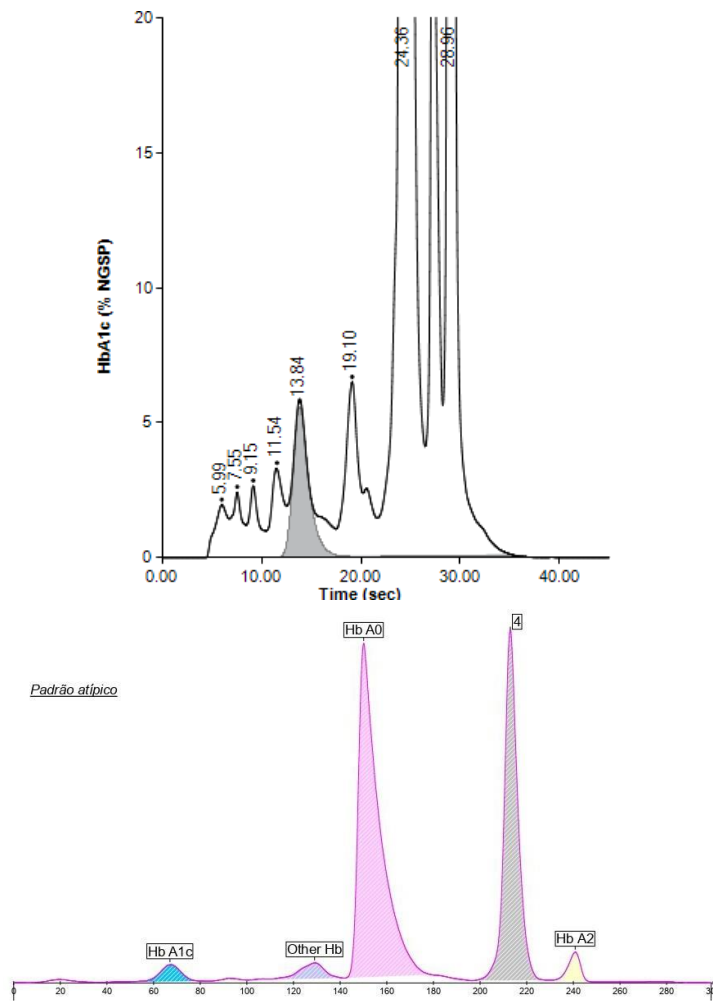
ANALITO	RAZÃO PELA QUAL É QUANTIFICADO
PROTEÍNAS TOTAIS	É um teste de <i>screening</i> para ver se os níveis de proteína estão de acordo com o valor esperado
ALBUMINA	O nível de albumina permite avaliar o estado nutricional
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)	Avaliar distúrbios hepáticos
ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)	Avaliar doença hepática, mais específico para doenças hepáticas do que AST
FOSFATASE ALCALINA (ALP)	Avaliação de doenças ósseas e hepáticas
GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE (GGT)	Avaliar doença ou dano hepático
LACTATO DESIDROGENASE (LD)	Indicadora (não específica) de dano no tecido
CREATINA CINASE (CK)	Sendo indicadora de dano muscular a subunidade CK-MB (creatina cinase isoforma MB) desta enzima é elevada cerca de 4-6 horas após um ataque cardíaco (infarte do miocárdio)
AMILASE	Para diagnosticar pancreatite
LIPASE	Para diagnosticar pancreatite
HEMOGLOBINA GLICADA (HbA1c)	Em diabéticos, é um bom controlo da glicose durante um período de 3 meses
TROPONINAS	Diagnóstico de ataque cardíaco (infarte do miocárdio)
PEPTÍDEO NATRIURÉTICO DO TIPO B (BNP) E PORÇÃO N-TERMINAL DO PRO-BNP (NT-proBNP)	Ambos são usados para detetar e avaliar insuficiência cardíaca

Hemoglobina Glicada

A hemoglobina glicada A1c (HbA1c) é a fração mais importante da hemoglobina HbA1. Esta é irreversivelmente glicada em uma ou nas duas valinas do N-terminal da cadeia β da hemoglobina. A HbA1c reflete a glicose plasmática durante os 3 meses que antecedem a análise, por isso o teste à HbA1c é uma parte indispensável do controlo e monitorização da diabetes. Esta quantificação permite avaliar a eficácia da terapêutica. Além disso, auxilia o diagnóstico da diabetes *mellitus* e ajuda na identificação de pacientes em risco de desenvolver esta patologia, isto porque a análise da HbA1c é prognóstico de complicações diabéticas (Kojić Damjanov et al., 2014).

A colheita de sangue para o doseamento da HbA1c não necessita de ser feita em jejum, podendo ser a qualquer hora do dia. Por esta razão, é um parâmetro de eleição para o controlo dos doentes diabéticos (World Health Organization, 2011).

Esta análise é feita na amostra de sangue total com EDTA através da técnica de HPLC. No caso de haver resultados com valores muito diferentes do histórico do doente, interferências ou presença de outras variantes de hemoglobina, é efetuada uma análise confirmatória utilizando outra metodologia (eletroforese capilar) (Figura 26).



A1c Haemoglobin Electrophoresis

Fractions	%	mmol/mol	Cal. %
Hb A1c (*)	-	35	5,4
Other Hb	3,3		
Hb A0	54,6		
4	36,5		
Hb A2	2,7		

HbA1c % cal :(*) = 5,4 %

HbA1c mmol/mol :(*) = 35 mmol/mol

(*) Padrão atípico

Figura 26: Em cima, cromatograma de uma HA1c com presença de uma variante de hemoglobina, HbS, e respetivo perfil eletroforético, em baixo (Porcentagem de HbS é de 36,5%) (SPC, 2022)

Lípidos e lipoproteínas

Os lípidos são moléculas hidrofóbicas, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Estas moléculas desempenham um papel essencial no organismo porque realizam funções endócrinas, energéticas, estruturais e participam na digestão. Os lípidos que circulam no plasma incorporados em complexos de macromoléculas são designados de lipoproteínas (Rifai et al., 2008).

Os lípidos e lipoproteínas são quantificados principalmente como indicadores de risco de doença cardiovascular. Alguns dos analitos avaliados no perfil lipídico podem estar elevados como resultado de outras doenças existentes, como hipotireoidismo, diabetes ou doença renal. É importante, por isso, saber a história clínica do doente e descartar essas possíveis causas de anormalidades lipídicas (Reed, 2016) (Tabela 17).

Tabela 17: Lípidos e lipoproteínas - Analito e razão pela qual é quantificado

ANALITO	RAZÃO PELA QUAL É QUANTIFICADO
COLESTEROL TOTAL	O colesterol alto é um fator de risco para doença arterial coronária
COLESTEROL LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL)	Parte do perfil de risco cardiovascular
COLESTEROL LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)	Parte do perfil de risco cardiovascular
TRIGLICERÍDEOS	Parte do perfil de risco cardiovascular

Monitorização de fármacos

Alguns fármacos requerem monitorização da sua concentração sanguínea, nomeadamente aquelas que têm uma janela terapêutica estreita. Isto significa que há uma concentração definida na qual o fármaco é ativo e eficaz, sem apresentar toxicidade. Se a concentração descer do limite inferior, não há eficácia. Por outro lado, se for mais elevado que o limite superior, o doente apresenta risco de problemas de saúde devido à toxicidade. O objetivo é garantir que o doente recebe o tratamento adequado, o que, por vezes, pode ser desafiante quando se usam medicamentos com janelas terapêuticas estreitas, como é o caso de alguns antibióticos (Reed, 2016). O laboratório de patologia clínica desempenha assim um papel fundamental ao testar a concentração do medicamento no momento em que se espera que a concentração atinja um máximo, isto para avaliar o risco de toxicidade. Contudo, imediatamente antes da próxima dose, ou seja, quando se espera que o medicamento esteja na sua concentração

mínima, também deve ser feito o doseamento para garantir e manter quantidades terapêuticamente eficazes (Kang et al., 2009).

Alguns exemplos de drogas terapêuticas doseadas no SPC são: ácido valpróico, acetaminofeno, teofilina, tobramicina, vancomicina, fenitoína, metotrexato, ampicilina, carbamazepina, digoxina, gentamicina, fenobarbital e lítio.

Toxicologia e drogas de abuso

Muitas substâncias que se encontram comercialmente disponíveis e de uso comum podem ser tóxicas se consumidas em quantidades que excedem a capacidade de metabolização do corpo. Num ambiente de urgência, é comum ver-se overdoses de drogas associadas à toxicidade das mesmas. O laboratório desempenha assim um papel fundamental no diagnóstico desta condição (Reed, 2016).

A maioria dos testes a este tipo de drogas são feitos usando amostras de urina. Os resultados são interpretados de forma qualitativa, onde um resultado positivo indica a presença da droga acima de um determinado nível (*cutoff*). Podem ser realizados testes adicionais nas amostras positivas através de métodos quantitativos para confirmar a presença do analito (H. Porter, 2008).

Algumas das análises feitas no SPC incluem: anfetaminas, benzodiazepinas, canabinóides, cocaína e opiáceos.

Pesquisa de Sangue Oculto

A análise da pesquisa do sangue oculto nas fezes é um método eficaz para diagnosticar precocemente patologias como o cancro do cólon (Rex et al., 2017). A quantificação da hemoglobina humana é feita pelo equipamento automatizado SENTiFIT 270, com base no princípio descrito a seguir. Há mistura entre a solução fecal tampão com um reagente de látex com anticorpo anti-hemoglobina humana e as partículas de látex reagem com amostras de fezes que contêm hemoglobina humana. A aglutinação das partículas de látex é proporcional à concentração de hemoglobina na amostra. Ao aplicar um fator de conversão (concentração de hemoglobina na solução tampão) consegue-se determinar a concentração de hemoglobina humana nas fezes (Auge et al., 2018).

6.3. Bioquímica Urinária

Realiza-se a análise sumária de urina ou urina tipo II e a sumária de urina com sedimento, a fim de se avaliar a função renal. A análise sumária de urina inclui a avaliação físico-química da urina e a observação do sedimento urinário. Esta análise é complementar ao diagnóstico e monitorização de várias patologias, entre elas as doenças renais e infeções do trato urinário (McPherson et al., 2011).

Para este tipo de análise feita por rotina recomenda-se que seja feita a colheita por jato intermédio da primeira urina da manhã, que é a mais concentrada. No entanto, para medições quantitativas, é necessária uma amostra de urina de 24 horas (McPherson et al., 2011).

As características físicas da urina que são avaliadas são a medição da densidade e a análise visual que permite caracterizar a cor e o aspeto. A análise química é feita através da interpretação de uma tira química que permite avaliar os seguintes parâmetros: pH, proteína, glicose, corpos cetónicos, hemoglobina, bilirrubina, urobilinogénio, nitritos e leucócitos. Estas tiras consistem numa série de pequenas áreas reativas, onde estão impregnados os reagentes, que quando em contacto com a urina (através de reações químicas) resulta numa alteração da cor, que será detetada por refletância (McPherson et al., 2011).

Frequentemente revela-se importante avaliar também o sedimento urinário pois auxilia na deteção de doenças renais e do trato urinário. O sedimento é obtido através da centrifugação da urina e a avaliação, por citometria de fluxo, consiste na identificação e caracterização dos elementos presentes na amostra, nomeadamente leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, células com grânulos, muco, microrganismos (leveduras, bactérias e hifas), cilindros hialinos e granulados, e cristais, que de acordo com a sua morfologia é possível classificar quanto à sua composição (exemplo: urato, ácido úrico, fosfato, oxalato de cálcio, entre outros). O sedimento urinário centrifugado deverá ter todos os materiais insolúveis que se acumulam na urina após o processo de filtração glomerular e durante a passagem pelos túbulos renais e pelo trato urinário inferior (McPherson et al., 2011).

No SPC, são utilizados o AutionMAX e o SediMAX que são dois equipamentos automatizados para a análise sumária de urina, que como já referido anteriormente engloba o exame físico-químico e a análise do sedimento urinário.

O exame físico-químico é realizado no AutionMAX através de diferentes técnicas fotométricas. O SediMAX é constituído por uma centrífuga e um microscópio com uma câmara incorporada, possibilitando a obtenção de imagens de 15 campos diferentes (Palmieri et al., 2018). As imagens obtidas são transmitidas através do *software* do

equipamento (Menasoft), sendo feita, logo de seguida, a avaliação do sedimento urinário.

Parte 2- Estudo de caso de um doente com Mieloma Múltiplo: importância do diagnóstico laboratorial tendo em conta os vários setores do Laboratório de Patologia Clínica

1. Gamopatias Monoclonais

1.1. Mieloma Múltiplo

As gamopatias monoclonais são um grupo de distúrbios clínicos relacionados com a proliferação monoclonal de plasmócitos e são caracterizadas pela secreção monoclonal de uma imunoglobulina (Ig), denominada proteína monoclonal (PM) ou paraproteína, ou por um fragmento de Ig no soro e/ou urina. Para ser considerada gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) a PM no soro deverá ser inferior a 30 g/L e os plasmócitos na medula óssea deverão ser inferiores a 10%. São ainda critérios necessários para o diagnóstico de MGUS a ausência de envolvimento de órgãos-alvo (ossos, rim e medula óssea) e a ausência de evidência clínica de mieloma múltiplo (MM), macroglobulinémia de Waldenstrom, linfoma ou amiloidose (Parreira et al., 2014).

O MM é precedido por uma fase MGUS ou de mieloma assintomático (Hungria et al., 2013). É uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos malignos no microambiente da medula óssea associado ao surgimento de proteína monoclonal sérica e/ou urinária e presença de disfunção de órgãos-alvo (Hungria et al., 2013). O MM é a segunda neoplasia hematológica mais comum com uma incidência estimada na Europa de 4,5-6,0/100 000/ano (Dimopoulos et al., 2021).

As células do mieloma, plasmócitos com mutações, produzem e secretam PM (têm origem no mesmo clone) no sangue e/ou na urina e a quantidade de PM produzida varia de doente para doente. É importante saber se as células do mieloma de um doente não são secretoras (sem libertação de proteína no sangue ou na urina), ou se são muito ou pouco produtoras, pois auxilia na interpretação da relação entre um determinado nível da proteína e a carga tumoral do mieloma (Durie, 2018). A acumulação das Igs não funcionais e a interação dos plasmócitos monoclonais com outras células da medula óssea origina alterações hematológicas, incluindo anemia e/ou baixa contagem de leucócitos ou plaquetas, lesões ósseas, insuficiência renal e

hipercalcémia (Brigle et al., 2017). A PM é produzida e libertada na corrente sanguínea e/ou na urina, havendo redução da função imune normal, refletida por níveis reduzidos de imunoglobulinas normais e aumento da suscetibilidade à infeção (mais provável se a contagem de leucócitos for baixa) (Durie, 2018).

Segundo o *International Myeloma Working Group* (IMWG)¹ a nova definição de mieloma múltiplo ativo é: percentagem de células plasmáticas clonais na medula óssea > 10% ou plasmocitoma ósseo ou extramedular demonstrado por biópsia e qualquer uma ou mais das características CRAB (**c**alcium **e**levation, **r**enal **d**ysfunction, **a**nemia, **b**one **d**isease) e eventos definidores de mieloma, que se encontram descritos na tabela 18.

Tabela 18: Critérios de Diagnóstico de MM¹

Critérios IMWG, 2014

MM	<p>Percentagem de células plasmáticas clonais na medula óssea > 10% e/ou plasmocitoma ósseo ou extramedular demonstrado por biópsia;</p> <p>Diagnóstico baseado na evidência de lesões de órgãos atribuída a doença proliferativa de células plasmáticas subjacente (critérios CRAB):</p> <ul style="list-style-type: none">• Hipercalcémia: cálcio sérico > 0.25 mmol/L (> 1 mg/dL) maior do que limite superior de normalidade ou > 2.75mmol/L (> 11mg/dL);• Insuficiência renal: clearance creatinina < 40 mL/min ou creatinina sérica > 177 µmol/L (> 2 mg/dL);• Anemia: hemoglobina > 20 g/L abaixo do limite inferior de normalidade, ou valor de hemoglobina < 100 g/L;• Lesões ósseas: uma ou mais lesões osteolíticas observadas na radiografia, tomografia computadorizada (CT), ou tomografia por emissão de positrões com tomografia computadorizada (PET-CT) <p>Um ou mais dos seguintes biomarcadores de malignidade:</p> <ul style="list-style-type: none">• Percentagem de células plasmáticas clonais ≥ 60 %;• Razão cadeias leves livres (CLL) séricas “involved/uninvolved” ≥ 100*;• Mais de 1 lesão focal (osso ou medula óssea) nos estudos de Imagem por Ressonância Magnética (MRI)**. <p>*Cadeia leve livre “involved”, kappa ou lambda, é aquela que está acima do intervalo de referência e deve ser ≥ 100 mg/L. Cadeia leve livre “uninvolved” está dentro ou abaixo do intervalo referência.</p> <p>**Cada lesão focal deve ser ≥ 5 mm de tamanho</p>
----	--

¹Adaptado de: <https://www.myeloma.org/international-myeloma-working-group-imwg-criteria-diagnosis-multiple-myeloma>, consultado dia 16/06/2022

De notar que não é necessária a presença de PM como critério de diagnóstico para MM. A presença ou ausência de proteína monoclonal é utilizada para distinguir, respetivamente, o MM secretor do MM não secretor (Rajkumar et al., 2014).

O diagnóstico de MM inclui estudos laboratoriais, estudos de urina, biópsia de medula óssea e avaliação radiológica. A análise laboratorial inclui um hemograma completo com contagem diferencial de leucócitos e contagem plaquetária, doseamentos de LDH e β 2-microglobulina, eletroforese de proteínas séricas (proteinograma) com quantificação da PM (se for possível), imunofixação do soro, doseamento sérico de imunoglobulinas e de CLL. Os estudos de urina incluem uma amostra de urina de 24 horas para eletroforese de proteínas totais e imunofixação. A biópsia de medula óssea inclui imuno-histoquímica e/ou citometria de fluxo, análise FISH e citogenética. As sondas FISH devem detetar, no mínimo, a presença de del13, del17p, t(4;14), t(11;14), t(14;16) e amplificação 1q21 (Brigle et al., 2017).

Além do doseamento de CLL é possível realizar o ensaio que permite quantificar o par de cadeias pesadas/leves (*Heavy/Light Chain-HLC*). Uma quantificação o mais correta possível da proteína monoclonal é de máxima importância para o diagnóstico, prognóstico e follow-up de doentes com MM e outras gamopatias monoclonais. Assim, o *Hevylite* é um imunoensaio totalmente automatizado que deteta especificamente os diferentes pares de cadeia pesada/leve (IgG κ /IgG λ , IgA κ /IgA λ , IgM κ /IgM λ), com a finalidade de proporcionar uma quantificação precisa do par HLC monoclonal/envolvido (iHLC) e o par HLC policlonal/não envolvido (uHLC) do mesmo isotipo (Tabela 19). De salientar que o limite de deteção do ensaio HLC é inferior ao dos métodos convencionais (eletroforese de proteínas séricas, eletroforese capilar e imunofixação) atualmente usados para a deteção de imunoglobulinas monoclonais no soro (Ríos-tamayo et al., 2021). Este ensaio é particularmente útil e deve fazer-se em situações em que a PM não é visível no proteinograma ou, sendo visível, se encontra a co-migrar com outras proteínas na região Beta ou mesmo na região Gama de eletroforese.

Semelhante ao doseamento de CLL, o ensaio HLC pode fornecer uma medição sensível de clonalidade através da razão HLC (HLCr) em pacientes que produzem PMs. A sensibilidade do diagnóstico HLCr é próxima a 99% em doentes com MM (Ríos-tamayo et al., 2021).

Apesar deste ensaio ainda não estar incluído nas *guidelines* do diagnóstico de MM, deverá fazer-se pela importância que tem, principalmente em doentes que produzem PMs como a IgA. Estudos propõem que através deste ensaio se possa substituir todos os ensaios que atualmente se fazem em doentes com MM IgA com padrão de migração na região β (beta) do proteinograma, e o mesmo para doentes com

IgG e IgM (Ríos-tamayo et al., 2021). Como já dito anteriormente, quando é detetada uma PM por eletroforese sérica e/ou doseamento de CLL, deverá ser feita a imunofixação. Desta forma, o isotipo de PM presente é identificado e o imunoensaio HLC pode ser realizado (Ríos-tamayo et al., 2021). No que diz respeito à monitorização, esta é baseada em resultados de HLC e doseamento de CLL (quando existem). O uso combinado destes ensaios permite a deteção de alterações na concentração no isotipo da PM devido à informação sobre a evolução clonal (Ríos-tamayo et al., 2021).

Tabela 19: Descrição dos parâmetros do imunoensaio HLC. Adaptado de (Ríos-tamayo et al., 2021)

Parâmetro	Definição	Descrição	Exemplo num doente IgAk
iHLC	HLC envolvida	Par monoclonal HLC produzido por plasmócitos	IgAk
HLCr	Razão HLC κ/λ	Indica clonalidade	IgAk/IgA λ
dHLC	Diferença HLC	Diferença na concentração entre iHLC e uHLC	IgAk-IgA λ
uHLC	HLC não envolvida	Par policlonal HLC do mesmo isotipo	IgA λ

O tratamento de doentes com MM inclui terapia de indução, quimioterapia de alta dose com transplante de células estaminais hematopoiéticas, uso de radiação para preservar a medula óssea, terapia de manutenção, cuidados de saúde como medicação para dor, fatores de crescimento, antibióticos e terapia antiviral, monitorização de doença resistente a medicamentos e terapias novas e experimentais: drogas imunomoduladoras Thalomid®, Revlimid®, Pomalyst® (pomalidomida), inibidores do proteassoma injetáveis Velcade® e Kyprolis® e anticorpos monoclonais (Durie, 2018).

No que diz respeito ao *follow-up* de doentes com MM deve ser realizado mensalmente ou pelo menos a cada 3 meses um hemograma completo, eletroforese de proteínas do soro e urinárias e doseamento de CLL séricas, doseamento de creatinina e cálcio. Em caso de dor óssea, deve ser feita CT, ressonância magnética ou PET-CT para detetar novas lesões ósseas (Dimopoulos et al., 2021).

1.2. Caso clínico

Doente do género masculino, com 74 anos de idade com pedido de consulta do Hospital de Castelo Branco. O doente recorreu ao Hospital de Castelo Branco no dia 25/11/2021 com queixas de dor no ombro direito com 5 dias de evolução, estando referida queda cerca de um mês antes; doente refere que não terá tido dores após a queda. Foi feito Raio-X, que levantou hipótese de fratura patológica, tendo realizado CT do ombro, que refere fratura patológica com componente expansivo de tecidos moles intramedular, com lesão expansiva da omoplata e glenóide com destruição cortical.

Foram realizadas análises no dia 28/01/2022 na consulta de Hematologia/Oncologia, estando apresentados na tabela 20 os parâmetros com os respetivos resultados e valores de referência.

Tabela 20: Análises realizadas no dia da consulta de Hematologia/Oncologia do dia 28/01/2022 (SPC,2022)

Hemograma		
Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Leucócitos	5.3 x 10 ⁹ /L	3.60-10.5 x10 ⁹ /L
Eritrócitos	2.65 x10 ¹² /L	4.00-5.65 x10 ¹² /L
Hemoglobina	8.9 g/dL	11.8-15.8 g/dL
Hematócrito	25.5%	37-49%
Plaquetas	99 x10 ⁹ /L	140-385 x10 ⁹ /L
Plaquetócrito	0.10%	0.20-0.45%
Bioquímica (Sangue)		
Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Azoto Ureico	21.3 mg/dL	7.9 - 20.9 mg/dL
Creatinina	2.14 mg/dL	0.72 - 1.18 mg/dL
Sódio	131 mmol/L	136 - 146 mmol/L
Cloro	99 mmol/L	101 - 109 mmol/L
Albumina	3.3 g/dL	3.5 - 5.2 g/dL
Cálcio	8.5 mg/dL	8.8 - 10.6 mg/dL
Proteína C Reactiva	1.41 mg/dL	< 0.50 mg/dL
Imunologia		
Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Imunoglobulina A	28.18 g/L	1.01 - 6.45 g/L
Cadeias Leves Lambda	11.79 g/L	2.06 - 7.69 g/L
Relação Kappa/Lambda	0.36	1.30 - 2.61
Cadeias Leves Kappa Livres	27.8 mg/L	3.30 - 19.40 mg/L
Cadeias Leves Lambda Livres	2153.9 mg/L	5.71 - 26.30 mg/L

Relação Kappa Livre/Lambda Livre	0.010	Sem insuficiência renal: 0.26 - 1.65 Com insuficiência renal: 0.37 - 3.1
Relação cadeias leves livres envolvidas/não envolvidas	77.56	
Beta 2 Microglobulina	14.70 mg/L	0.97 - 2.64 mg/L

A pesquisa de cadeias leves kappa e lambda urinárias revelou o valor de 0.068 g/24h e 3.76 g/24h, respetivamente.

A insuficiência renal (creatinina sérica >2 mg/dL), anemia (hemoglobina <10 g/dL) e também as lesões ósseas (evidenciadas na CT) sugerem a evidência de lesão de órgão alvo associado à doença proliferativa neste doente.

Neste estudo foi realizada a eletroforese das proteínas séricas (Figura 27), tendo sido observada uma grande elevação (alteração) da fração Beta 1, provavelmente devido à presença de uma PM e detetaram-se valores anormais nas seguintes frações de proteínas: albumina, beta 1 e gama (Tabela 21). Assim, a interpretação feita foi: duas PMs na fração Beta. Foi feita também a imunofixação sérica (Figura 28) que permitiu confirmar e caracterizar a PM como sendo do isotipo IgA lambda com cadeias leves lambda livres. Relativamente à imunofixação urinária (Figura 28) observam-se cadeias pesadas Alfa (IgA) e leves Lambda Monoclonais.

Tabela 21: Valores obtidos do proteinograma do dia 28/01/2022 (SPC, 2022)

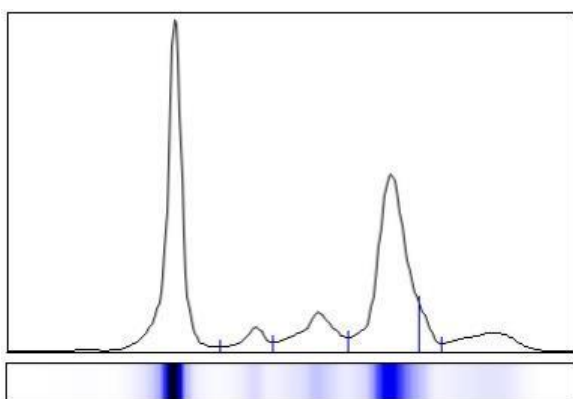


Figura 27: Eletroforese de proteínas séricas do dia 28/01/2022 (SPC, 2022)

Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Albumina	3.14 g/dL (39.2%)	3.35 - 5.29 g/dL
Alfa 1	0.31 g/dL (3.9%)	0.17 - 0.39 g/dL
Alfa 2	0.78 g/dL (9.8%)	0.43 - 0.94 g/dL
Beta 1	2.95 g/dL (36.9 %)	0.28 - 0.58 g/dL
Beta 2	0.25 g/dL (3.1%)	0.19 - 0.52 g/dL
Gama	0.57 g/dL (7.1%)	0.67 - 1.50 g/dL

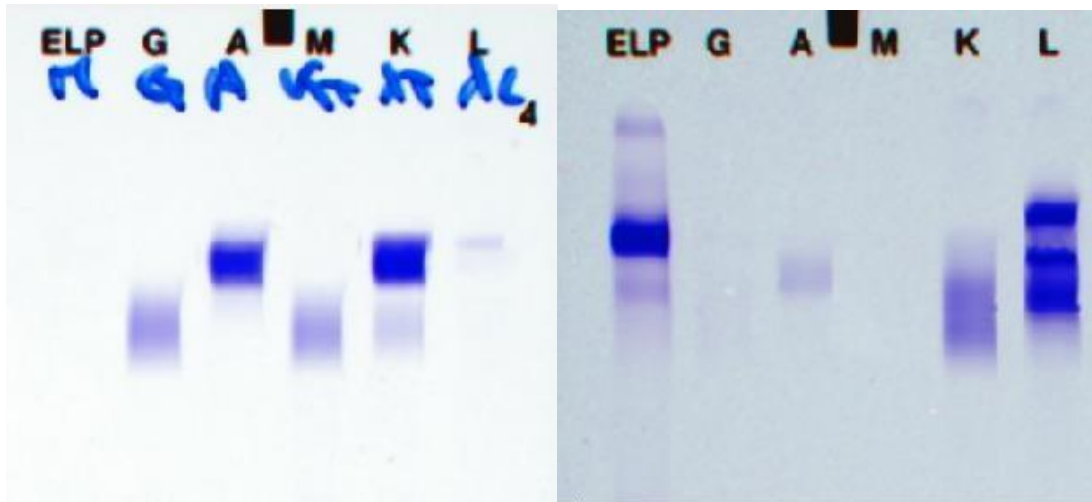


Figura 28: Imunofixação sérica (à esquerda) e urinária (à direita) do dia 28/01/2022 (SPC, 2022)

Quanto à imunofenotipagem, o estudo fenotípico do aspirado de medula óssea detetou a presença de 7% de plasmócitos, em que 99.8% destas células tinham um fenótipo diferente do das células plasmáticas da medula óssea normal. Do aspirado de medula óssea procedeu-se à separação dos plasmócitos para estudo por FISH, e o relatório deste estudo conclui que após hibridização *in situ* em plasmócitos observou-se ganho 1q21 em 40% dos núcleos. Os ganhos 1q21 são indicadores independentes de mau prognóstico citogenético em MM (Brigle et al., 2017). Quanto ao mielograma (estudo do aspirado de medula óssea) o relatório concluiu o seguinte: “Observaram-se fragmentos de celularidade variável (6 dos fragmentos observados apresentam células adiposas e ausência de tecido hematopoiético). Não se observaram megacariócitos. Linhas mielóide e eritróide presentes. Presença de cerca de 10.4% de plasmócitos (foram observados plasmócitos binucleados - atípicos)”.

Portanto, perante os resultados hematológicos, bioquímicos, doseamento de Igs, doseamento de CLL, eletroforese sérica e urinária, FISH e mielograma, o diagnóstico definitivo foi MM.

Depois de 1 e 3 meses deste diagnóstico foram realizadas novas análises e um dos ensaios efetuados foi o das *Hevylite* IgA, estando os resultados apresentados na seguinte tabela.

Tabela 22: Ensaio *Hevylite* IgA realizado no dia 08/03/2022 e 05/05/2022 (SPC, 2022)

Imunologia			
Parâmetro	Resultado dia 08/03/2022	Resultado dia 05/05/2022	Valores de Referência
IgA Kappa	0.185 g/L	0.489 g/L	0.432 - 2.035 g/L
IgA Lambda	22.574 g/L	9.461 g/L	0.588 - 2.984 g/L
Relação IgA Kappa/IgA Lambda	0.008	0.052	0.911 - 2.416
Relação IgA envolvida/IgA não envolvida	122.022	19.347	
Diferença IgA envolvida-IgA não envolvida	22	9	

Este ensaio é importante para monitorizar alterações na concentração no isotipo da proteína monoclonal, que neste caso é uma IgA. Com estes resultados conclui-se que a evolução clonal tem sofrido alterações favoráveis, pois todos os parâmetros melhoraram, nomeadamente a relação IgA envolvida/IgA não envolvida que diminuiu de 122.022 para 19.347, o que traduz uma diminuição da clonalidade (o clone de plasmócitos diminui a produção de PM).

No dia 05/05/2022 a quantificação de IgA revelou o valor de 13.45 g/L. No doseamento de CLL séricas obtiveram-se os seguintes valores: CLL kappa 22.2 mg/L e CLL lambda 657.5 mg/L. A pesquisa de cadeias leves kappa e lambda urinárias revelou o valor de 0.047 g/24h e 0.90 g/24h, respetivamente. Verifica-se uma melhoria em todos estes doseamentos, relativamente aos do dia 28/01/2022, data do diagnóstico. Foi realizada também imunofixação urinária, onde se pode visualizar, no gel, 2 bandas com o antissoro mono específico anti-cadeias leves Lambda porque estas cadeias formam dímeros (monómeros de 25 Kdalton e dímeros 50 Kdalton) (Figura 29).

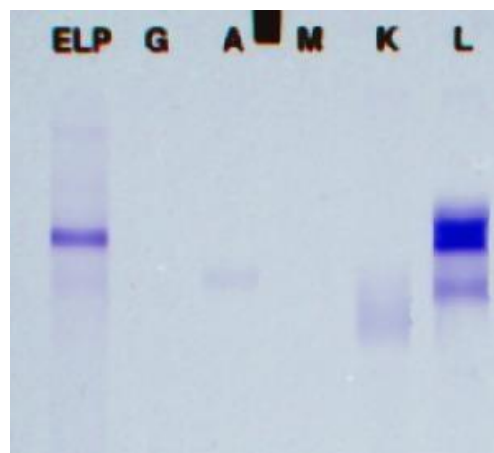


Figura 29: Imunofixação urinária do dia 05/05/2022 (SPC, 2022)

Concluindo, todos os setores que estiveram envolvidos neste estudo de caso (Hematologia, Bioquímica e Imunologia) foram igualmente importantes para o diagnóstico final. De realçar que são também imperativos no *follow-up* de doentes com esta condição clínica. Revela-se extremamente necessária a coordenação entre os setores do laboratório de patologia clínica visto que se aplicam diferentes metodologias (citometria, turbidimetria, nefelometria, quimioluminescência, eletroforese e FISH, neste caso particular) com um mesmo propósito: dar um resultado breve e confiável ao clínico, para que o diagnóstico seja igualmente rápido e se possa começar uma terapêutica, caso seja necessário.

7. Conclusão

O estágio curricular que realizei foi bastante importante para mim pois foi uma experiência que me enriqueceu tanto a nível profissional como pessoal, na medida em que sou mais responsável e com maior sentido crítico. Ter tido o privilégio de estagiar neste serviço de patologia clínica do CHUC permitiu-me ter o contacto direto com um laboratório de referência a nível da região centro. Tive a possibilidade de fazer parte integrante de uma equipa multidisciplinar de profissionais de saúde e pude contribuir positivamente como um membro estagiário. Desde o primeiro momento tive o apoio incondicional de todos os especialistas e técnicos, tendo-me sido transmitidos conhecimentos fundamentais em todas as valências que constituem o laboratório e tive o incentivo à pesquisa autónoma, pela procura das bases científicas que fundamentam os procedimentos e metodologias aplicadas no que diz respeito às diferentes patologias.

Durante o meu período de estágio foi possível consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do meu percurso académico, observando e participando na realização de técnicas laboratoriais da rotina hospitalar, de forma a atingir os objetivos iniciais do meu plano de estágio.

Um dos aspetos que mais me surpreendeu assenta na quase total automatização do laboratório de patologia clínica do CHUC, devido ao grande número de amostras que são rececionadas (também pelo elevado fluxo de doentes que se dirigem às urgências deste hospital) e a exigência de uma resposta o mais atempada possível. Estas variáveis são tidas, maioritariamente, em conta para um ambiente hospitalar. No entanto reduzir o tempo de resposta nos resultados de análises clínicas é uma necessidade constante e que deve caracterizar todos os laboratórios de análises. O número total de análises

realizadas no SPC, por setor, durante o meu período de estágio encontra-se ilustrado na Figura 30.

Considero que as dificuldades que senti foram no sentido das rotações laboratoriais que estavam previamente definidas e da necessidade de ter de ajustá-las devido ao grande número de internos de Patologia Clínica, estagiários da licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais e também do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia. Outra dificuldade foi o facto de não ter conhecimento sobre todas as patologias com que me fui deparando no dia-a-dia do laboratório, resultando numa pesquisa quase diária sobre as mesmas, o que ao início foi desafiante, mas tornou-se num obstáculo que ultrapassei com esforço e dedicação.

Este relatório de estágio é fruto de um trabalho exigente e árduo que desempenhei de forma persistente ao longo do Mestrado em Ciências Biomédicas. Sempre me disseram que se não lutarmos pelos nossos sonhos, os sonhos não se tornam realidade, por isso, este trabalho espelha a concretização de mais um sonho.

Número de análises realizadas no SPC durante o período de estágio

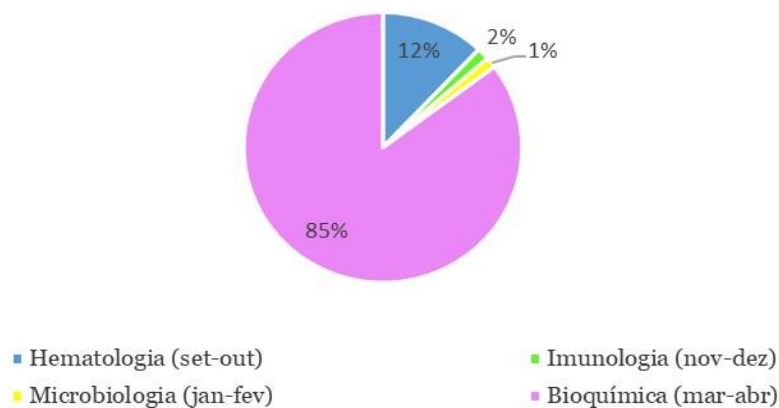


Figura 30: Número de análises realizadas no SPC nos setores de Hematologia (entre setembro e outubro), Imunologia (entre novembro e dezembro), Microbiologia (entre janeiro e fevereiro) e Bioquímica (entre março e abril) (SPC, 2022)

Bibliografia

- A. McPherson, R., & Ben-Ezra, J. (2011). Basic Examination Of Urine. In *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (22nd ed., pp. 445–479). Elsevier.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., & Baker, D. L. (2018). Properties and Overview of Immune Responses. In *Cellular and Molecular Immunology* (9th Edition, pp. 1–11). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-3123-9.50006-1>
- Al-Hakim, M. (1993). Essentials of Clinical Neurophysiology. In *Neurology* (Vol. 43, Issue 8). <https://doi.org/10.1212/wnl.43.8.1634-b>
- Allison, T. L. (2016). Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Nursing Clinics of North America*, 51(1), 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2015.10.008>
- Annesley, T. M., Rockwood, A. L., & Sherman, N. E. (2008). Mass Spectrometry. In *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6th ed., pp. 128–139). Saunders Elsevier.
- Auge, J. M., Rodriguez, C., Espanyol, O., Rivero, L., Sandalinas, S., Grau, J., Jimenez, W., & Castells, A. (2018). An evaluation of the SENTiFIT 270 analyser for quantitation of faecal haemoglobin in the investigation of patients with suspected colorectal cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 56(4), 625–633. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0605>
- Azinhira, M. do P., & Castro, R. M. (1998). Diagnóstico Laboratorial em Microbiologia. In *Microbiologia Volume 1* (pp. 207–220). Lidel.
- B. Sacks M.B, D. (2008). Carbohydrates. In *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6th ed., pp. 373–401). Saunders Elsevier.
- BARONE, A. ., & FERNANDES, A. P. (2009). Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica. *Imunologia Básica Para o Clínico*, 73–94.
- Barros, C. (2019). Autoanticorpos nas Doenças Autoimunes sistémicas. In *Guia do Internista de Medicina Interna* (António Ma). <http://hdl.handle.net/10400.26/36807>
- Baynes, J. W., & Marek H., D. (2014). *Medical Biochemistry* (4th edition, Vol. 4). Saunders Elsevier.
- Becton Dickinson GmbH. (2006). BBL Cooked Meat Medium. In *BD Diagnostics* (pp. 1–4).
- Becton Dickinson GmbH. (2009). *BD Sabouraud Glucose Agar* (pp. 1–5). <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9079>
- Becton Dickinson GmbH. (2012). BD CLED Agar. In *Bd* (Vol. 1, Issue 1, pp. 1–4).
- Becton Dickinson GmbH. (2013a). BD Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood. In

- Media* (Issue June, pp. 2–5). <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9063>
- Becton Dickinson GmbH. (2013b). *BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)* (pp. 1–6). BD Diagnostics.
- Becton Dickinson GmbH. (2013c). *BD Hektoen Enteric Agar (HE Agar)* (pp. 1–4).
- Becton Dickinson GmbH. (2013d). Instruções de Utilização - Agar Salmonella Shigella (Placas prontas para usar). In *BD Diagnostics* (Vol. 1, Issue 1, pp. 6–9).
- Becton Dickinson GmbH. (2013e). *Instruções de Utilização - BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (Placas prontas para usar)* (pp. 1–4). <http://www.bd.com>
- Becton Dickinson GmbH. (2016). *BD BBL™ MGIT™: Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA™ Antibiotic Mixture* (p. 32). BD Diagnostics.
- Becton Dickinson GmbH. (2019). *BD Campylobacter Agar (Skirrow)*. In *BD Diagnostics* (p. 4). <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=25736>
- Becton Dickinson GmbH. (2013). *BD Yersinia Selective Agar (CIN)*. In *BD Diagnostics* (pp. 1–4).
- Bento, J., Silva, A. S., Rodrigues, F., & Duarte, R. (2011). Métodos Diagnósticos Em Tuberculose. *Acta Medica Portuguesa*, 24(1), 145–154.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gregory, J. G. J., & Stryer, L. (2015). Biochemistry: An Evolving Science. In *Biochemistry* (8th edition, pp. 1–25). W.H. Freeman & Company.
- Bielsa, S., Bernet, A., Civit, C., Acosta, C., Manonelles, A., & Porcel, J. M. (2021). FluoroType® MTB in pleural fluid for diagnosing tuberculosis. *Revista Clínica Española (English Edition)*, 221(3), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2020.04.010>
- bioMérieux. (2022). *Chocolate PolyViteX - Isolamento das bactérias exigentes*. bioMérieux Brasil.
- Bossuyt, X., De Langhe, E., Borghi, M. O., & Meroni, P. L. (2020). Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(12), 715–726. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00522-w>
- Brigle, K., & Rogers, B. (2017). Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing*, 33(3), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2017.05.012>
- Brown, D. F. J., Giske, C. G., Heisig, P., Macgowan, A. P., & Mouton, J. W. (2011). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Infect.*
- Buchner, C., Bryant, C., Eslami, A., & Lakos, G. (2014). Anti-nuclear antibody screening using HEP-2 cells. *Journal of Visualized Experiments*, 88, 1–8.

- <https://doi.org/10.3791/51211>
- Burns, C. (2015). Automation in Hematology. In *Clinical Laboratory Hematology* (3rd edition, pp. 829–852). Pearson.
- Carroll, K. C., Jorgensen, J. H., & Pfaller, M. A. (2006a). Campylobacter and Arcobacter. In *Manual of Clinical microbiology - Volume 1* (11th ed., pp. 998–1012). American Society for Microbiology.
- Carroll, K. C., Jorgensen, J. H., & Pfaller, M. A. (2006b). Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology. In *Manual of Clinical microbiology - Volume 1* (11th ed., pp. 270–315). American Society for Microbiology.
- Carrondo, A. P. (2018). Transplantação de Órgãos : Importância da Intervenção Farmacêutica na Adesão e Monitorização Terapêutica. *Revista Portuguesa De Farmacoterapia*, 10(2–3), 26–29.
- CDC. (2022). *Malaria*.
https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnostic_tools.html#tabs-2-2
- Cecilia Donayre, P. C., Zeballos, H. E., & Sánchez, B. J. (2013). Realidad de la fase pre-analítica en el laboratorio clínico. *Revista Medica Herediana*, 24(4), 325.
<https://doi.org/10.20453/rmh.v24i4.280>
- Chapel, H., Haeney, M., Siraj, M., & Neil, S. (2014a). Neuroimmunology. In *Essentials of Clinical Immunology* (6th edition, pp. 312–323). Wiley-Blackwell.
- Chapel, H., Haeney, M., Siraj, M., & Neil, S. (2014b). Techniques in Clinical Immunology. In *Essentials of Clinical Immunology* (pp. 332–350). Wiley-Blackwell.
- Chauhan, R., Vimarsh, R., & Nandi, S. P. (2019). Prevalence of Autoimmune Diseases and Its Challenges in Diagnosis. *Crit Rev Immunol*, 39(3), 189–201.
- Chaves, T. F., & Nicolau, L. S. (2013). Citogenética & Cariotipagem Humana
Cytogenetics and Human Karyotyping Citogenética Y El Cariotipo Humano. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 4(2), 10.
<https://www.revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/article/view/229>
- Ciesla, B. (2007). Introduction to hematology and basic laboratory practices. In *Hematology in practice* (pp. 3–14). Philadelphia : F.A. Davis Co.
- Cinquanta, L., Fontana, D. E., & Bizzaro, N. (2017). Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights*, 8(1). <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2>
- Clark, K. S., Hippel, T. G., & Whitfield, D. B. (2020). Manual, Semiautomated, and Point-of-Care Testing in Hematology. In *Rodak's Hematology: Clinical Principles*

And Applications (6th edition, pp. 154–173). Elsevier.

- Clarke, S. C., & McIntyre, M. (1996). Short reports Modified detergent Ziehl Neelsen technique for the staining of *Cyclospora cayetanensis* Gelatinous degeneration presenting as a. *J Clin Pathol*, *49*(February), 511–552.
- Correia, C., Costa, E., Peres, A., Alves, M., Pombo, G., & Estevinho, L. (2007). Etiologia das infecções do tracto urinário: E sua susceptibilidade aos antimicrobianos. *Acta Medica Portuguesa*, *20*(6), 543–549.
- Cotsapas, C., Mitrovic, M., & Hafler, D. (2018). Multiple sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology*, *148*(1942), 723–730. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00046-6>
- Cristino, J. M. (2000). Staphylococcus. In *Microbiologia Volume 2* (pp. 39–50). Lidel.
- D’Amico, G., & Bazzi, C. (2003). Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, *63*(3), 809–825. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00840.x>
- Damoiseaux, J., Andrade, L. E. C., Carballo, O. G., Conrad, K., Francescantonio, P. L. C., Fritzler, M. J., Garcia De La Torre, I., Herold, M., Klotz, W., Cruvinel, W. D. M., Mimori, T., Von Muhlen, C., Satoh, M., & Chan, E. K. (2019). Clinical relevance of HEP-2 indirect immunofluorescent patterns: The International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *78*(7), 879–889. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214436>
- Deters, M., Kaefer, V., & Kirchner, G. I. (2003). Liquid chromatography/mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Analytica Chimica Acta*, *492*(1–2), 133–145. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00410-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00410-0)
- Devreese, K. M. J., de Groot, P. G., de Laat, B., Erkan, D., Favaloro, E. J., Mackie, I., Martinuzzo, M., Ortel, T. L., Pengo, V., Rand, J. H., Tripodi, A., Wahl, D., & Cohen, H. (2020). Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *18*(11), 2828–2839. <https://doi.org/10.1111/jth.15047>
- Dimopoulos, M. A., Moreau, P., Terpos, E., Mateos, M. V., Zweegman, S., Cook, G., Delforge, M., Hájek, R., Schjesvold, F., Cavo, M., Goldschmidt, H., Facon, T., Einsele, H., Boccadoro, M., San-Miguel, J., Sonneveld, P., & Mey, U. (2021). Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *32*(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.014>
- Durie, B. G. M. (2018). *Concise Review of the Disease and Treatment Options -*

- Multiple Myeloma Cancer of the Bone Marrow*. International Myeloma Foundation.
- Enhancement, S. E. (2016). *SEED_Challenges in monocyte counting*. April, 1–8.
- EUROIMMUN. (2017). *Anti-Histonas ELISA (IgG)*. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG.
- EUROIMMUN. (2018). *Anti-M2-3E ELISA (IgG)*. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG.
- EUROIMMUN. (2021a). *IFA*. <https://www.euroimmun.com/products/techniques/ifa/>
- EUROIMMUN. (2021b). *Immunoblot*.
<https://www.euroimmun.com/products/techniques/immunoblot/>
- Farnig, E., & Friedrich, J. B. (2011). Laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis. *Journal of Hand Surgery*, 36(5), 926–927.
<https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2011.01.036>
- Fonseca, A., Sebastião, C., Martins, F., Ribeiro, M., Calheiros, I., Lito, L. M., Abecassis, M., Pinto, M., Spencer, M., Pinheiro, M., Costa, M., Barros, R., & Bento, R. (2004). Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. In *Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge*.
- Freitas, G. (2000). Micoses Cutâneas e Mucocutâneas. In *Microbiologia Volume 2* (pp. 309–328). Lidel.
- Fritsche, T. R., & Selvarangan, R. (2011). Medical Parasitology. In *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (pp. 1188–1238). Elsevier.
- Garg, N., & Smith, T. W. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and Behavior*, 5(9), 1–13.
<https://doi.org/10.1002/brb3.362>
- Gateau, C., Couturier, J., Coia, J., & Barbut, F. (2018). How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(5), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.005>
- H. Porter, W. (2008). Clinical Toxicology. In *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6th ed., pp. 562–602). Saunders Elsevier.
- Hewison, C. J., Heath, C. H., & Ingram, P. R. (2012). Stool culture. *Australian Family Physician*, 41(10), 775–779.
- Hiraoka, S., Takashima, S., Inokuchi, T., Nakarai, A., Takahara, M., Harada, K., Seki, Y., Watanabe, K., Kato, J., & Okada, H. (2019). The Novel Latex Agglutination Turbidimetric Immunoassay System for Simultaneous Measurements of Calprotectin and Hemoglobin in Feces. *Intestinal Research*, 17(2), 202–209.
<https://doi.org/10.5217/ir.2018.00086>
- Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. H. (2016a). Erythropoiesis and anaemia. In *Hoffbrand's*

- Essential Haematology* (7th ed., pp. 11–26). John Wiley & Sons Ltd.
- Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. H. (2016b). Hypochromic anaemias. In *Hoffbrand's Essential Haematology* (7th ed., pp. 27–40). John Wiley & Sons Ltd.
- Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. H. (2016c). Platelets, blood coagulation and haemostasis. In *Hoffbrand's Essential Haematology* (7th edition, pp. 264–277). John Wiley & Sons Ltd.
- Hornbeck, P. V. (2015). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current Protocols in Immunology*, 2015(August), 2.1.1-2.1.23.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>
- Hungria, V. T. de M., Maiolino, Â., Almeida, M. de S. S., & Crusoé, E. de Q. (2013). Distúrbios dos Plasmócitos e Doenças Correlatas. In *Tratado de Hematologia* (1st edition, pp. 555–568). Atheneu.
- ICAP. (2021). *Nomenclature and classification tree - ANA Patterns*.
<https://www.anapatterns.org/trees-2021.php>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & H. Yong, W. (2019). An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Physiology & Behavior*, 173(3)(1), 665–676. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5>
- J. Bain, B. (2016a). Alterações quantitativas das células sanguíneas. In *Células Sanguíneas - Um Guia Prático* (5th ed., pp. 232–276). Artmed Editora.
- J. Bain, B. (2016b). Técnicas de contagem de glóbulos. In *Células Sanguíneas - Um Guia Prático* (5th edition, pp. 17–66). Artmed Editora.
- Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2018). Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*, 93(3), 442–459. <https://doi.org/10.1002/ajh.25011>
- Jaisson, S., Leroy, N., Guillard, E., Desmons, A., & Gillery, P. (2015). Analytical performances of the D-100TM hemoglobin testing system (Bio-Rad) for HbA1c assay. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53(9), 1473–1479.
<https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0288>
- Jang, K. S., & Kim, Y. H. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *Journal of Microbiology*, 56(4), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7457-0>
- Johnson, M. (2008). Amino Acids and Proteins. In *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6th ed., pp. 286–316). Saunders Elsevier.
- Kang, J. S., & Lee, M. H. (2009). Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean Journal of Internal Medicine*, 24(1), 1–10.
<https://doi.org/10.3904/kjim.2009.24.1.1>
- Kang, Z. J., Liu, Y. F., Xu, L. Z., Long, Z. J., Huang, D., Yang, Y., Liu, B., Feng, J. X.,

- Pan, Y. J., Yan, J. S., & Liu, Q. (2016). The philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>
- Keohane, E. M. (2020). An Overview of Clinical Laboratory Hematology. In *Rodak's Hematology: Clinical Principles And Applications* (6th edition, pp. 1–7). Elsevier.
- Koivunen, M. E., & Krogsrud, R. L. (2006). Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Laboratory Medicine*, 37(8), 490–497.
<https://doi.org/10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F>
- Kojić Damjanov, S., Đerić, M., & Eremić Kojić, N. (2014). Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation. *Medicinski Pregled*, 67(9–10), 339–344. <https://doi.org/10.2298/MPNS1410339K>
- Kristoffersen, A. H., Hammer, I. J., Vannes, S., Åsberg, A., & Aakre, K. M. (2019). Impact of different preanalytical conditions on results of lupus anticoagulant tests. *International Journal of Laboratory Hematology*, 41(6), 745–753.
<https://doi.org/10.1111/ijlh.13102>
- Laboratories, M. clinic. (2019). *Test Definition : TPPA Test Definition : TPPA* (pp. 1–7). Mayo Clinic Laboratories.
- Laffan, M. A., & Manning, R. A. (2017a). Investigation of a Thrombotic Tendency. In *Dacie and Lewis Practical Haematology* (12th editi, pp. 410–424). Elsevier.
- Laffan, M. A., & Manning, R. A. (2017b). Investigation of Haemostasis. In *Dacie and Lewis Practical Haematology* (12th editi, pp. 366–409). Elsevier.
- Landis-Piwowar, K., John Landis, M., & Poulson, K. (2015). The Complete Blood Count and Peripheral Blood Smear Evaluation. In *Clinical Laboratory Hematology* (3rd edition, pp. 154–177). Pearson.
- Laranjeira, P., Rodrigues, T., Silva, A., Barbosa, P., Reis, T., Lopes, C., Pinho, A., Silva, S., Silva, I., Carvalho, A., Pacheco, V., Rodrigues, F., Araújo, L., Antunes, I., & Paiva, A. (2022). A single dose of COVID-19 vaccine induces a strong T cell and B cell response in healthcare professionals recovered from SARS-CoV-2 infection. *Clinical and Experimental Medicine*, 0123456789.
<https://doi.org/10.1007/s10238-022-00801-8>
- Levinson, W. (2011a). Estrutura de Células Bacterianas. In *Microbiologia médica e imunologia* (pp. 16–26). Artmed Editora.
- Levinson, W. (2011b). Microbiota normal. In *Microbiologia médica e imunologia* (pp. 37–40). Artmed Editora.
- Liofilchem. (2006). Brain Heart Infusion Broth. In *Liofilchem* (Issue April, pp. 1–2).
- Mackie, I. J., Kitchen, S., Machin, S. J., & Lowe, G. D. O. (2003). Guidelines on fibrinogen assays. *British Journal of Haematology*, 121(3), 396–404.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04256.x>

Mahler, M., Bentow, C., Serra, J., & Fritzler, M. J. (2016). Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(1), 14–20.

<https://doi.org/10.3109/08923973.2015.1077461>

Mantovani, M., Mecawi, A. S., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2011).

Padronização do Radioimunoensaio (Rie) para dosagem de angiotensina Ii (Ang-Ii) e sua validação metodológica. *Sociedade Brasileira de Protecao Radiologica (SBPR)*, 42(36).

Marlar, R. A., & Husain, S. (2008). The enigmas of the lupus anticoagulant:

Mechanisms, diagnosis, and management. *Current Rheumatology Reports*, 10(1), 74–80. <https://doi.org/10.1007/s11926-008-0013-x>

McCudden, C. R., Mathews, S. P., Hainsworth, S. A., Chapman, J. F., Hammett-Stabler, C. A., Willis, M. S., & Grenache, D. G. (2008). Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for the identification and characterization of monoclonal immunoglobulins. *American Journal of Clinical Pathology*, 129(3), 451–458. <https://doi.org/10.1309/6KT8N49BRNVVBT1>

McPherson, R. A., & Ben-Ezra, J. (2011). Basic Examination Of Urine. In *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (22nd ed., pp. 445–479). Elsevier.

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

Meireles, M. C. (2018). *Genética Molecular e Biomedicina aliados do Laboratório de Patologia Clínica*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa.

Milos, M., Herak, D., Kuric, L., Horvat, I., & Zadro, R. (2009). Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer - HemosIL reagents. *International Journal of Laboratory Hematology*, 31(1), 26–35. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2007.00999.x>

Mirante, C., Clemente, I., Zambu, G., Alexandre, C., Ganga, T., Mayer, C., & Brito, M. (2016). Comparing concentration methods: Parasitrap® versus Kato-Katz for studying the prevalence of helminths in Bengo province, Angola. *African Health Sciences*, 16(3), 698–703. <https://doi.org/10.4314/ahs.v16i3.9>

Monlab. (2013). Waaler Rose. *Spinreact*, 1, 4–5.

http://www.spinreact.com/files/Inserts/inserts_portugues/SGISO5-P_-_Ref__1200501_WR__2013.pdf

Moore, T. L., Weiss, T. D., Neucks, S. H., Baldassare, A. R., & Zuckner, J. (1981).

- Extractable nuclear antigens. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 10(4), 309–318. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(81\)90007-X](https://doi.org/10.1016/0049-0172(81)90007-X)
- Noordegraaf, M., Meijer, P., & Ruinemans-Koerts, J. (2016). Diagnostic efficiency of the Sysmex XN WPC channel for the reduction of blood smears. *Clinical Biochemistry*, 49(16–17), 1292–1294. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.020>
- O’Connell, T. X., Horita, T. J., & Kasravi, B. (2005). Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *American Family Physician*, 71(1), 105–112.
- Olshaker, J. S., & Jerrard, D. A. (1997). The erythrocyte sedimentation rate. *Journal of Emergency Medicine*, 15(6), 869–874. [https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(97\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(97)00197-2)
- Palmieri, R., Falbo, R., Cappellini, F., Soldi, C., Limonta, G., & Brambilla, P. (2018). The development of autoverification rules applied to urinalysis performed on the AutionMAX-SediMAX platform. *Clinica Chimica Acta*, 485(May), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.07.001>
- Pang, R. (2015). A Practical Guide to Internal Quality Control (IQC) for Quantitative Tests in Medical Laboratories (Proposed Guidelines) Version 2.0. *Hong Kong Association of Medical Laboratories Limited*.
- Park, K. H., Lee, J., Sim, D. W., & Lee, S. C. (2018). Comparison of singleplex specific ige detection immunoassays: ImmunoCAP Phadia 250 and Immulite 2000 3gAllergy. *Annals of Laboratory Medicine*, 38(1), 23–31. <https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.1.23>
- Parreira, J., Lúcio, P., João, C., Macedo, A., Sarmento, A. B., Geraldés, C., Gonçalves, C., & Esteves, G. (2014). Gamapatias Monoclonais de Significado Indeterminado: Critérios de Diagnóstico e Acompanhamento Clínico. *Acta Médica Portuguesa*, 27(5), 661–664.
- Pedret, S. V., Rodríguez, P. C., Vizcaíno, I. R., & Vidriales, J. L. C. (2007). Errores relacionados con el laboratorio clínico. *Química Clínica*, 26(1), 23–28.
- Pessegueiro, P., Barata, C., & Correia, J. (2003). Brucelose – uma revisão sistematizada. *Medicina Interna*, 10(2), 91–100.
- Previsdomini, M., Gini, M., Cerutti, B., Dolina, M., & Perren, A. (2012). Predictors of positive blood cultures in critically ill patients: A retrospective evaluation. *Croatian Medical Journal*, 53(1), 30–39. <https://doi.org/10.3325/cmj.2012.53.30>
- Programa Nacional para a Tuberculose. (2020). *Manual de Tuberculose e Micobactérias não tuberculosas - Recomendações* (Direção-Geral da Saúde (ed.)).
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B.,

- Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., ... Miguel, J. F. S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, *15*(12), e538–e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
- Reed, R. (2016). Common Clinical Chemistry Tests. In *Clinical Chemistry Learning Guide series* (pp. 66–87). Abbott.
- Regeniter, A., & Siede, W. H. (2018). Peaks and tails: Evaluation of irregularities in capillary serum protein electrophoresis. *Clinical Biochemistry*, *51*(March 2017), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.09.017>
- Rex, D. K., Boland, C. R., Dominitz, J. A., Giardiello, F. M., Johnson, D. A., Kaltenbach, T., Levin, T. R., Lieberman, D., & Robertson, D. J. (2017). Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *American Journal of Gastroenterology*, *112*(7), 1016–1030. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.174>
- Rifai, N., Warnick, G. R., & Remaley, A. T. (2008). Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. In *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6th ed., pp. 402–430). Saunders Elsevier.
- Ríos-tamayo, R., Puig, N., Algarín, M., Luís, J., Veas, G. De, & Barbosa, N. (2021). *The current role of the heavy / light chain assay in the diagnosis , prognosis and monitoring of multiple myeloma : an evidence- based approach. Mm*, 1–19.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2017a). Basophil Maturation. In *Clinical Hematology Atlas* (5th edition, pp. 75–78). Elsevier.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2017b). Eosinophil Maturation. In *Clinical Hematology Atlas* (5th edition, pp. 65–74). Elsevier.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2017c). Erythrocyte Maturation. In *Clinical Hematology Atlas* (5th edition, pp. 17–30). Elsevier.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2017d). Lymphocyte Maturation. In *Clinical Hematology Atlas* (5th edition, pp. 79–88). Elsevier.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2017e). Megakaryocyte Maturation. In *Clinical Hematology Atlas* (5th edition, pp. 31–40). Elsevier.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2017f). Monocyte Maturation. In *Clinical Hematology Atlas* (5th edition, pp. 55–64). Elsevier.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2017g). Neutrophil Maturation. In *Clinical Hematology Atlas* (5th edition, pp. 41–54). Elsevier.
- Saboor-Yaraghi, A. A. (2000). Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações Método: princípios e fatores envolvidos. *Rev Ass Med Brasil*, *46*(3), 232–236. <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v46n3/3082.pdf>

- Sack, U., Conrad, K., Csernok, E., Frank, I., Hiepe, F., Krieger, T., Kromminga, A., Von Landenberg, P., Messer, G., Witte, T., & Mierau, R. (2009). Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1173, 166–173. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04735.x>
- Sanz, M. A., Fenaux, P., Tallman, M. S., Estey, E. H., Löwenberg, B., Naoe, T., Lengfelder, E., Döhner, H., Burnett, A. K., Chen, S. J., Mathews, V., Iland, H., Rego, E., Kantarjian, H., Adès, L., Avvisati, G., Montesinos, P., Platzbecker, U., Ravandi, F., ... Lo-Coco, F. (2019). Management of acute promyelocytic leukemia: Updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*, 133(15), 1630–1643. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-01-894980>
- Schapkaitz, E., & Raburabu, S. (2018). Performance evaluation of the new measurement channels on the automated Sysmex XN-9000 hematology analyzer. *Clinical Biochemistry*, 53(January), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.01.014>
- SEBIA. (2012). *HYDRAGEL 4 IF Masque dynamique*.
- SEBIA. (2013). *HYDRAGEL 5 PROTEINURIE*.
- SEBIA. (2021a). *Eletroforese Capilar de Proteínas Séricas*. <https://www.sebia.com/pt-pt/tests/eletroforese-capilar-de-proteinas-sericas/>
- SEBIA. (2021b). *Imunofixação do Soro e da Urina*. <https://www.sebia.com/pt-pt/tests/imunofixacao-do-soro-e-da-urina/>
- Serrano, M. R. G., Escartín, N. L., Arriaza, M. M., & Díaz, J. C. R. (2019). Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 37, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.005>
- Sharma, P., & Das, R. (2016). Cation-exchange high-performance liquid chromatography for variant hemoglobins and HbF/A2: What must hematopathologists know about methodology? *World Journal of Methodology*, 6(1), 20. <https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i1.20>
- Singh, G. (2020). Serum and Urine Protein Electrophoresis and Serum-Free Light Chain Assays in the Diagnosis and Monitoring of Monoclonal Gammopathies. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 5(6), 1358–1371. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa153>
- Sousa, J. P. C. de, Rodrigues, A. M., & Exposto, F. (2000). Mycobacterium. In *Microbiologia Volume 2* (pp. 85–98). Lidel.
- Sousa, M. J., Neves, E., Figueiras, O., Cruz, A. P., Fernandes, I., Mendes, A., Santos, M. do C., Cunha, R., Magueijo, L., Pratas, C., Miranda, A., & Ribeiro, R. (2021).

- International consensus on antinuclear antibody patterns in Portugal. *Acta Medica Portuguesa*, 34(5), 347–354. <https://doi.org/10.20344/amp.13121>
- SPC, C. (2022). *Atlas Micologia*. <https://atlasmicologia.blogspot.com/>
- Stankovic, A. K., & DiLauri, E. (2008). Quality Improvements in the Preanalytical Phase: Focus on Urine Specimen Workflow. *Clinics in Laboratory Medicine*, 28(2), 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2007.12.011>
- Sternbæk, L., Friis, T., & Houen, G. (2019). Determination of autoantibodies by line immunoblotting. *Methods in Molecular Biology*, 1901, 255–262. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8949-2_22
- Stevens, W. S., Scott, L., Noble, L., Gous, N., & Dheda, K. (2017). Impact of the GeneXpert MTB/RIF technology on tuberculosis control. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus: Second Edition*, 389–410. <https://doi.org/10.1128/9781555819569.ch18>
- Stop, D. (2013). Product Catalog Product Catalog. *Measurement, September*, 36–39.
- Stopper, B. (2012). Tecnologia e Parâmetros Clínicos Avançados. *Sysmex*.
- Sundqvist, M., Niemietz, I., Gibson, K. M., Brown, K. L., & Bowers, S. M. (2020). *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): Antigen interactions and downstream effects*. February, 1–10. <https://doi.org/10.1002/JLB.3VMR0220-438RR>
- Sunheimer, R. L., Gregory A. Threatte, Pincus, M. R., & Lifshit, M. S. (2011). Analysis: Principles Of Instrumentation. In *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (22nd editi, pp. 37–63). Elsevier.
- Sysmex. (2012). *Novo Design Novas Possibilidades Analisadores Hematológicos Automatizados Série - XN*. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Português.pdf>
- Sysmex. (2016). Platelet detection and the importance of a reliable count. *Sysmex Educational Enhancement & Development, August*, 1–7.
- Sysmex. (2021a). *Sysmex - Nucleated red blood cells (NRBC)*. <https://www.sysmex.es/n/es-pt/academia/knowledge-centre/parametros-sysmex/nucleated-red-blood-cells-nrbc.html>
- Sysmex. (2021b). *Sysmex - Products Details*. <https://www.sysmex-europe.com/n/products/products-detail/xn-9000.html>
- Sysmex. (2021c). *Sysmex - Technologies*. <https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/technologies.html>
- Sysmex. (2022). *Sysmex UF-5000*. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Urinalysis/UN-Series-Urinalysis/Pages/SysmexUF-5000.aspx>

- Thorpe, T. C., Wilson, M. L., Turner, J. E., Diguisseppi, J. L., Willert, M., Mirrett, S., Reller, L. B., & Carolina, N. (1990). *BacT/Alert: an Automated Colorimetric Microbial Detection System*. 28(7), 1608–1612.
- Tille, P. M. (2017a). Bacteriology. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 205–589). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017b). Basic Medical Microbiology. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (Fourteenth, pp. 1–41). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017c). Campylobacter, Arcobacter, and Helicobacter. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 452–461). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017d). Laboratory Methods and Strategies for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 177–204). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017e). Mycobacteria and Other Bacteria with Unusual Growth Requirements. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 524–554). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017f). Overview of Fungal Identification Methods and Strategies. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 757–781). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017g). Overview of Immunochemical Methods Used for Organism Detection. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 144–160). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017h). Overview of the Methods and Strategies in Parasitology. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 590–628). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017i). Role of Microscopy. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 72–85).
- Tille, P. M. (2017j). Specimen Management. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (pp. 56–71). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017k). Streptococcus, Enterococcus, and Similar Organisms. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (Fourteenth, pp. 264–282). Elsevier.
- Tille, P. M. (2017l). Traditional Cultivation and Identification. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (Fourteenth, pp. 86–112). Elsevier.
- Turgeon Louise, M. (2014a). An Overview of Immunology. In *Immunology & Serology in Laboratory Medicine* (5th ed., pp. 1–9). Elsevier.
- Turgeon Louise, M. (2014b). Electrophoresis Techniques. In *Immunology & Serology in Laboratory Medicine* (5th ed., pp. 151–159). Elsevier.
- Turgeon Louise, M. (2014c). Immunoproliferative Disorders. In *Immunology & Serology in Laboratory Medicine* (5th ed., pp. 366–381). Elsevier.
- Turgeon Louise, M. (2014d). Labeling Techniques in Immunoassay. In *Immunology & Serology in Laboratory Medicine* (5th Edition, pp. 160–169). Elsevier.
- Ullman, M. D., & A. Burtis, C. (2008). Chromatography. In *Tietz Fundamentals of*

- Clinical Chemistry* (6th ed., pp. 112–127). Saunders Elsevier.
- van Hage, M., Hamsten, C., & Valenta, R. (2017). ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(4), 974–977.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.008>
- Wattal, C., Oberoi, J. K., Goel, N., Raveendran, R., & Khanna, S. (2017). Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *36*(5), 807–812. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2864-9>
- Weiner, M., & Segelmark, M. (2016). The clinical presentation and therapy of diseases related to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity Reviews*, *15*(10), 978–982. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.016>
- Wenzel, J., Gerdson, R., Uerlich, M., Bauer, R., Bieber, T., & Boehm, I. (2001). Antibodies targeting extractable nuclear antigens: Historical development and current knowledge. *British Journal of Dermatology*, *145*(6), 859–867.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04577.x>
- Winter, W. E., Flax, S. D., & Harris, N. S. (2017). Coagulation testing in the core laboratory. *Lab Medicine*, *48*(4), 295–313.
<https://doi.org/10.1093/labmed/lmx050>
- World Health Organization. (2011). *Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation*.
- Yilmaz, M., Kantarjian, H., & Ravandi, F. (2021). Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal*, *11*(6).
<https://doi.org/10.1038/s41408-021-00514-3>
- Yu, L., Wang, J., O'Dell, J. R., Oates, J., Arend, W. P., & Eisenbarth, G. S. (2007). Anti-dsDNA antibody assay: High specificity and sensitivity with a filtration radioassay in comparison to low specificity with the standard ELISA. *Journal of Rheumatology*, *34*(4), 734–739.

Anexos

I. Algoritmo de identificação das diferentes patologias (DAIs) no SPC do CHUC



3

ESTUDO E MONITORIZAÇÃO DE PATOLOGIAS AUTO-IMUNES - PESQUISA / ORIENTAÇÃO DIAGNÓSTICA	
Anticorpos Antinucleares e Citoplasmáticos (ANA)	IFI (Células HEP2) IF Sprinter®
<p>- Avaliação da presença de IF, características da positividade com identificação de padrões de fluorescência nas diferentes estruturas celulares (núcleo, nucléolos, citoplasma e mitoses).</p> <p>- Eventual necessidade de esclarecimento/confirmação de dúvida nos padrões observados – Repetição das amostras em células HEP2 de outra casa comercial, processadas no equipamento Mago 4®.</p>	
Anticorpos Anti-Antígenos Nucleares Extrafaveis (ENA)	CLIA Bioflash®
<p>- Pesquisa simultânea de anticorpos anti-SSA (Ro60), anti-Ro52/TRIM21, anti-SSB (La), anti -Sm, anti -RNP, anti -Scl70 (topoisomerase I) e anti -Jo1.</p> <p>- Se a pesquisa for positiva é realizada posteriormente a identificação individual dos diferentes autoanticorpos.</p>	

ALGORITMO DIAGNÓSTICO NA IDENTIFICAÇÃO DE AUTOANTICORPOS - SEGUNDO PADRÕES DE FLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS HEP 2 -	
Parâmetro	Metodologia/Equipamento
FLUORESCÊNCIA NUCLEAR HOMOGÉNEA – AC-1 – Nuclear Homogéneo	
Anticorpos Anti-dsDNA	FEIA (ImmunoCap 250®) IFI substrato: <i>Crithidia luciliae</i>
Anticorpos Anti-Histonas	Radioimunoensaio (RIA) (Wallac Wizard 1470® Automatic Gamma Counter)
Anticorpos Anti-Nucleossoma	ELISA (Analyzer I®) Immunoblotting (EUROblotOne®)
FLUORESCÊNCIA NUCLEAR MEMBRANAR – AC-11- Membrana Nuclear linear / AC-12 – Membrana Nuclear Ponteada	
Anticorpos Anti-Gp210	Immunoblotting (EUROblotOne®)
Anticorpos Anti Lamina	IFI (IF Sprinter®)
FLUORESCÊNCIA NUCLEAR PONTEADA – AC-3 – Centrômero / AC-6 – Múltiplos Pontos Nucleares / AC-7 – Raros Pontos Nucleares	
Anticorpos Anti-Centrômero	IFI (IF Sprinter®) / Immunoblotting (EUROblotOne®)
Anticorpos Anti-Sp100	Immunoblotting (EUROblotOne®)
FLUORESCÊNCIA NUCLEAR MOSQUEADA – AC-2 – Nuclear Mosqueado Fino Denso	
Anticorpos Anti-DFS70	CLIA (Bioflash®) Immunoblotting (EUROblotOne®)

FLUORESCÊNCIA NUCLEAR MOSQUEADA – AC-4 – Nuclear Mosqueado Fino AC-5 – Nuclear Mosqueado Grosseiro	
Anticorpos Anti-SSA/Ro Anticorpos Anti-SSB/La	CLIA (Bioflash®) Immunoblotting (EUROblotOne®)
Anticorpos Anti-Ku Anticorpos Anti-Mi2	Immunoblotting (EUROblotOne®)
Anticorpos Anti-Sm Anticorpos Anti-RNP	CLIA (Bioflash®) Immunoblotting (EUROblotOne®)
FLUORESCÊNCIA NUCLEAR PLEOMÓRFICA – AC-13 – Pleomórfico (tipo PCNA) / AC-14 Pleomórfico (tipo CENP-F)	
Anticorpos Anti-PCNA	IFI (IF Sprinter®) Immunoblotting (EUROblotOne®)
Anticorpos Anti-CENP-F (MSA3)	IFI (IF Sprinter®)
FLUORESCÊNCIA NUCLEOLAR – AC-8 – Nucleolar Homogéneo / AC-9 – Nucleolar Aglomerado / AC-10 Nucleolar Ponteadado	
Anticorpos Anti-PM-Scl75 Anticorpos Anti-PM-Scl100 Anticorpos Anti-Scl-70 Anticorpos Anti-Th/To Anticorpos Anti-Fibrilarina Anticorpos Anti-RNA Pol III 11kDa Anticorpos Anti-RNA Pol III 155kDa Anticorpos Anti-NOR 90	Immunoblotting (EUROblotOne®)
FLUORESCÊNCIA NUCLEAR – AC-29 – Nuclear granular (Tipo Topoisomerase I/ Scl-70)	
Anticorpos Anti-Scl-70	IFI (IF Sprinter®) Immunoblotting (EUROblotOne®)
FLUORESCÊNCIA NAS CÉLULAS EM MITOSE - AC-24 – Centrossoma / AC-25 – Fuso Mitótico/ AC-26 – Fuso Mitótico (NuMA-1) / AC-27 – Ponte Intercelular	
Anticorpos Anti-Centrossoma Anticorpos Anti-Fuso Mitótico Anticorpos Anti-Fuso Mitótico (NuMA-1) Anticorpos Anti-Ponte Intercelular	IFI (IF Sprinter®)
FLUORESCÊNCIA CITOPLASMÁTICA FILAMENTOSA - AC-15 – Citoplasmático filamentosso linear/ AC-16 -Citoplasmático filamentosso fibrilar/AC-17 – Citoplasmático filamentosso segmentar/AC-23 – Citoplasmático Anéis e bastonetes	
Anticorpos Anti-F-Actina Anticorpos Anti-Vimentina / Tropomiosina Anticorpos Anti-Vinculina Anticorpos Anti-Nematina	IFI (IF Sprinter®)



FLUORESCÊNCIA CITOPASMÁTICA GRANULAR - AC-18 – Citoplasmático granular (grânulos isolados) / AC-19 -Citoplasmático granular fino denso/ AC-20 – Citoplasmático granular fino/	
Anticorpos Anti-Lisossomas Anticorpos Anti-Ribossomas Anticorpos Anti-PL7 Anticorpos Anti-PL12 Anticorpos Anti-Jo1	Imunoblotting (EUROblotOne®)
FLUORESCÊNCIA CITOPASMÁTICA GRANULAR - AC-21 – Citoplasmático reticular (tipo Mitocondrial)	
Anticorpos Anti Mitocondriais	IFI (IF Sprinter®)
PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1α da PDC, E3BP/protein X	ELISA (Analyzer I®) FEIA (Immunocap 250®)
FLUORESCÊNCIA CITOPASMÁTICA GRANULAR - AC-22 – Citoplasmático polar (tipo Golgi)	
Anticorpos Anti-Golgi	IFI (IF Sprinter®)

ESTUDO E MONITORIZAÇÃO DE DOENÇAS AUTOIMUNES	
Parâmetro	Metodologia/Equipamento
DOENÇAS AUTOIMUNES DO TECIDO CONJUNTIVO	
Identificação de anticorpos dirigidos aos antígenos: - DFS70, SS-A, SS-B, Ro-52, Scl-70, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleossomas, histonas, proteína P ribossomal, AMA M2, RNP/Sm e Sm	Imunoblotting (EUROblotOne®)
ESCLEROSE SISTÉMICA	
Identificação de anticorpos dirigidos aos antígenos: - Scl-70, CENP A, CENP B, RP11, RP155, fibrilarina, NOR90, Th/To, PM-Scl-100, PM-Scl-75, Ku, PDGFR e Ro- 52	Imunoblotting (EUROblotOne®)
VASCULITES	
Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilo (ANCA's)	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Neutrófilos fixados com etanol e formalina
Avaliação do padrão de imunofluorescência: Peri nuclear (P), Citoplasmática (C) ou peri nuclear atípica (X); - Confirmação do padrão x-ANCA - identificação definitiva em neutrófilos fixados com metanol	
Anticorpos Anti-Mieloperoxidase (MPO)	FEIA (Immunocap 250®)
Anticorpos Anti-Proteinase 3 (PR3)	
Anticorpos Anti-Membrana Basal Glomerular	CLIA (Bioflash®) / Imunoblotting (EUROblotOne®)

DOENÇA HEPÁTICA AUTOIMUNE	
PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE AUTOANTICORPOS ASSOCIADOS A HEPATITE AUTOIMUNE	
Anticorpos Anti-Músculo Liso (ASMA) Anticorpos Anti-F Actina	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Cortes de mucosa gástrica, rim, fígado de rato e células de cultura da aorta de rato (VSM)
Anticorpos Anti-LKM (Liver Kidney Microsomal Antigen) Anticorpos Anti-LC1 (Liver Cytosol Type 1)	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Cortes de mucosa gástrica, rim, fígado de rato e células de cultura da aorta de rato (VSM) ELISA (Analyzer I®) Immunoblotting (EUROblotOne®)
Anticorpos Anti-Antigénio Hepático Solúvel e Pancreático (SLA/LP)	ELISA (Analyzer I®) Immunoblotting (EUROblotOne®)
PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE AUTOANTICORPOS ASSOCIADOS A COLANGITES	
Anticorpos Anti Mitocondriais	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Cortes de mucosa gástrica, rim, fígado de rato e células de cultura da aorta de rato (VSM)
Anticorpos Anti-Piruvato Desidrogenase (IgG)- M2	ELISA (Analyzer I®) / FEIA (Immunocap 250®)
Identificação de anticorpos dirigidos aos antigénios: - AMA-M2, M2-3E, Sp 100, PML, Gp 210, LKM-1, LC-1, SLA/LP, SS-A, Ro-52, SCL-70, CENP A, CENP B e PGDH	Immunoblotting (EUROblotOne®)
AUTOANTICORPOS NO SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO	
Anticorpos Anti-Cardiolipinas (IgG, IgM)	CLIA (Bioflash®) – Screening
Anticorpos Anti-β2-Glicoproteína I (IgG, IgM)	& ELISA (Mago 4®) - Amostras positivas por CLIA
AUTOANTICORPOS NA DOENÇA CELÍACA	
Anticorpos Anti-Transglutaminase Tecidual (IgA e IgG) Anticorpos Anti-Gliadina Deaminada (IgA e IgG)	FEIA (Immunocap 250®)
Anticorpos Anti-Endomísio (IgA e IgG)	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Cortes de fígado de primata
AUTOANTICORPOS NA ARTRITE REUMATÓIDE	
Anticorpos Anti Peptídeo Citrulinado Cíclico (CCP)	FEIA (Immunocap 250®)
AUTOANTICORPOS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	
Anticorpos Anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) (IgA e IgG)	ELISA (Mago 4®)
Anticorpos Anti x-ANCA	IFI (Mago 4®) Substrato: Neutrófilos fixados em metanol

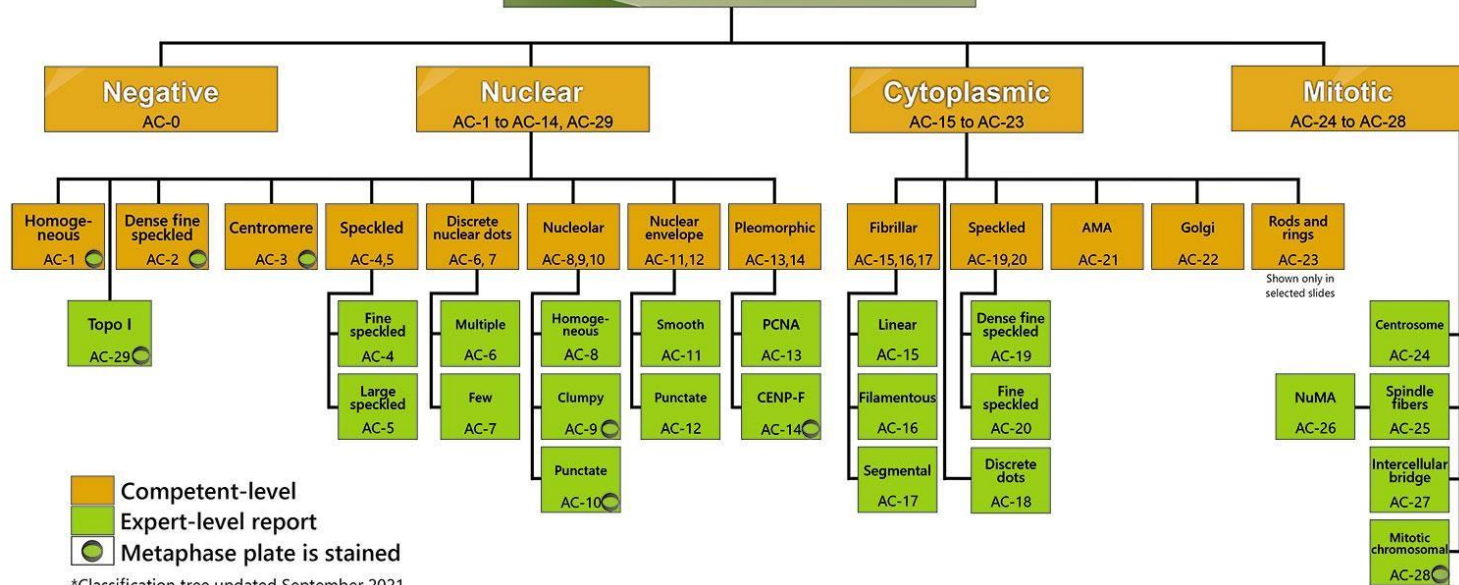
AUTOANTICORPOS NA ANEMIA PERNICIOSA	
Anticorpos Anti-Células Parietais Gástricas	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Cortes de estômago, rim e fígado de rato e cortes de estômago de macaco (Confirmatório)
Anticorpos Anti-Fator Intrínseco	ELISA (Analyzer I®)
AUTOANTICORPOS NA DIABETES MELLITUS	
Anticorpos Anti-Células dos Ilhéus de Langherans (ICA) Anticorpos Anti-Descarboxilase do Ácido-Glutâmico (GAD65) Anticorpos Anti-Proteína Tirosina Fosfatase (IA2)	CLIA (MAGLUMI 800®)
Anticorpos Anti-Insulina	Técnica manual + RIA (Wallac Wizard 1470® Automatic Gamma Counter)
AUTOANTICORPOS NA DOENÇA DE ADDISON	
Anticorpos Anti-Supra-Renal	IFI (Mago 4®) Substrato: Cortes de glândula supra-renal de macaco
Anticorpos Anti-21 Hidroxilase	Técnica manual + ELISA (Mago 4®)
AUTOANTICORPOS NAS MIOSITES	
Identificação de anticorpos dirigidos a antígenos: - PL7, PL12, Jo1, SRP, PMScl 75 e 100, Ku, Mi2, OJ, EJ, SAE1, NXP2, MDA5 e TIF1g	Immunoblotting (EUROblotOne®)
AUTOANTICORPOS NAS DERMATOSES AUTOIMUNES	
Anticorpos anti-pele (substância intercelular, membrana basal epiderme)	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Mosaico dermatológico
Anticorpos Anti-Desmogleína 1/Anti-Desmogleína 3 Anticorpos Anti-BP180 / Anti-B230	ELISA (Analyzer I®)
AUTOANTICORPOS NA MIASTENIA GRAVIS	
Anticorpos Anti Músculo Estriado	IFI (IF Sprinter®) Substrato: Músculo iliopsoas de macaco
Anticorpos Anti Receptor da Acetilcolina Anticorpos Anti-MuSK	Técnica manual + RIA (Wallac Wizard 1470® Automatic Gamma Counter)
AUTOANTICORPOS NAS POLINEUROPATIAS AUTOIMUNES	
Identificação de anticorpos IgM e IgG dirigidos aos antígenos Gangliosídeos: - GQ1b, GT1b, GD1b, GD1a, GM3, GM2, GM1)	Immunoblotting (EUROblotOne®)
Anticorpos Anti Glicoproteína Associada à Mielina (MAG)	Immunoblotting (EUROblotOne®)



AUTOANTICORPOS NOS SÍNDROMES PARANEOPLÁSICAS	
Identificação de anticorpos IgG dirigidos aos seguintes antígenos Neuronalis: - Hu, Yo, Ri, PNMA2/Ta, CV2.1, Anffisina, recoverin, SOX1, Titina, GAD65, Zic4, Tr	Immunoblotting (EUROblotOne®)
AUTOANTICORPOS NA NEUROMIELITE ÓTICA (NMO)OU DOENÇAS DO ESPECTRO DA NMO (NMOSD)	
Anticorpos Anti Aquaporina-4 (AQP-4)	IFI (IF Sprinter®)
Anticorpos Anti Glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG)	Substrato: células HEK transfetadas com AQP4/ células HEK transfetadas com MOG
AUTOANTICORPOS NAS ENCEFALITES AUTOIMUNES	
Identificação de anticorpos IgG dirigidos aos seguintes antígenos de superfície celular/sinapses: Anti- NMDA-R, CASPR2, AMPAR1/2, LGI1, DPPX, GABA-RB1/B2	IFI (IF Sprinter®) Substrato: células HEK transfetadas com NMDA-R, CASPR2, AMPA-R1/2, LGI1, DPPX, GABA-RB1/B2

II. Padrão de fluorescência HEP-2 (ICAP, 2021)

HEP-2 cell patterns











III. Lista de amostras biológicas, respetiva análise e colheita/meio de transporte (SPC, CHUC)








LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA












SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Aspirado Brônquico Lavado bronco-alveolar Expetoração	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril 
	Pesquisa de <i>Legionella</i> por cultura convencional	Zaragatoa com meio de transporte líquido (Amies) 
	Deteção molecular de microrganismos e de genes de resistência	
Exsudado da orofaringe	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril ou zaragatoa em meio de transporte de gel  
	Deteção molecular <i>Chlamydia</i> / <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Deteção molecular de microrganismos	Zaragatoa com meio de transporte líquido (Amies) 
Infeções respiratórias superiores ou inferiores	Deteção molecular	Contentor estéril ou Zaragatoa com meio de transporte vírico com inactivador   


ASPIRADOS /EXSUDADOS DE FERIDA E COLEÇÕES PURULENTAS

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Aspirado de ferida Aspirado de dreno abdominal	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril ou frasco porta-gérmes  
Exsudado da conjuntiva, ocular	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos leveduriformes	Meio de transporte BH1 ou contentor estéril 
	Deteção molecular <i>Chlamydia</i> / <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Zaragatoa com meio de transporte líquido (Amies)  
Exsudado de ferida cirúrgica / não cirúrgica	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos leveduriformes	Contentor estéril ou zaragatoa em meio de transporte de gel  



Relatório de Estágio Curricular realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e Estudo de Caso de um Doente com Mieloma Múltiplo

Exsudado da orofaringe	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos leveduriformes	Contentor estéril ou zaragatoa em meio de transporte de gel  
	Deteção molecular <i>Chlamydia</i> / <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Zaragatoa com meio de transporte líquido (Amies) 
Exsudado ouvido médio	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos leveduriformes	Contentor estéril ou zaragatoa em meio de transporte de gel  
Exsudado rectal Exsudado uretral	Deteção molecular <i>Chlamydia</i> / <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Zaragatoa com meio de transporte líquido (Amies) (mulher / homem)  
Pus de abscesso	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos leveduriformes	Contentor estéril ou frasco porta-gérmen  

ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA



AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Aspirado de medula óssea	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos leveduriformes	Frasco de hemocultura 

BÍLIS



AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Bilis	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril ou frasco porta-gérmen  

Relatório de Estágio Curricular realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e Estudo de Caso de um Doente com Mieloma Múltiplo


BIÓPSIA

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Biópsia	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Fragmento em contentor estéril, c/ adição 0,5 ml de soro estéril 
Biópsia gástrica	Pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i> por cultura convencional	Contentor estéril 

CONTROLO DE ESTERILIDADE AMBIENTAL

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Bolsa nutritiva	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Frasco de hemocultura ou Contentor estéril 
Controlo ambiental	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril 

ESPERMA


AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Esperma	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias	Contentor estéril 

FEZES



AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i>	Método imunocromatográfico Deteção molecular de genes da toxina	Contentor estéril 
Pesquisa de <i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultura convencional com identificação de bactérias	Contentor estéril 
Gastroenterites, painel sindrómico para estudo microbiológico de fezes diarreicas	Deteção molecular	Contentor estéril ou Zaragatoa com meio líquido <i>Cary-blair</i> 

Relatório de Estágio Curricular realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e Estudo de Caso de um Doente com Mieloma Múltiplo


HEMOCULTURAS

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Hemocultura – punção venosa, cateter	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Frasco de hemocultura 


LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
L.C.R.	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos Deteção molecular Meningite/encefalites, painel sindrómico	Contentor estéril 
Líquido pleural, pericárdico, peritoneal	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	
Líquido amniótico Líquido de drenagem da ansa Líquido de diálise Líquido de preservação do enxerto	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	
Líquido sinovial	Pesquisa de cristais Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril 


PONTAS DE CATETER/DRENO

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Ponta de cateter vascular /dreno	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril 

OUTROS PRODUTOS

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Placenta Próteses Material de necropsia Tubo endotraqueal	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril 





RASTREIOS

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Pesquisa de MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina)	Deteção molecular	Zaragatoa com meio de transporte líquido (Amies) 
Pesquisa de		Zaragatoa com meio de transporte líquido (Amies)

Relatório de Estágio Curricular realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e Estudo de Caso de um Doente com Mieloma Múltiplo

enterobactérias produtoras de carbapenemases		
Pesquisa de <i>Streptococcus</i> grupo B		Zaragatoa com esponja de transporte 
Pesquisa de ESBL	Cultura convencional em meio cromogénico	Zaragatoa com gel de transporte 

URINA

AMOSTRA	ANÁLISE	COLHEITA/ MEIO DE TRANSPORTE
Urina de jato médio, punção vesical, cateter	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Tubo com conservante  Contentor estéril 
	Deteção molecular <i>Chlamydia</i> / <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Contentor estéril 
Urina nefrostomia	Cultura convencional com identificação de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos	Contentor estéril 

IV. Lista Análises Serologia SPC, CHUC

Equipamento	Análises
Alinity	Anticorpos anti – <i>Toxoplasma gondii</i> - IgG Anticorpos anti – <i>Toxoplasma gondii</i> – IgM + IgM (LCR) Anticorpos anti - Rubéola - IgG Anticorpos anti - Rubéola - IgM + IgM (LCR) Anticorpos anti - Citomegalovirus (CMV) - IgG Anticorpos anti - Citomegalovirus (CMV) - IgM + IgM (LCR) Anticorpos anti - Epstein-Barr (EBV) -VCA IgG Anticorpos anti - Epstein-Barr (EBV) -VCA IgM + IgM (LCR) Anticorpos anti - Epstein-Barr (EBV) - EBNA Sífilis screening (IgG+IgM) Anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG (anti-SP) Anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM (anti-SP) Anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG (anti-NP)
Liaison XL	Anticorpos anti - <i>Chlamydia trachomatis</i> Ig A Anticorpos anti - <i>Chlamydia trachomatis</i> Ig G Anticorpos anti - Herpes simplex -HSV1 Ig G Anticorpos anti - Herpes simplex -HSV2 Ig G Anticorpos anti - Herpes simplex HSV 1+2 Ig M + IgM (LCR) Anticorpos anti - Herpes <i>Varicela-Zooster</i> IgG Anticorpos anti - Herpes <i>Varicela-Zooster</i> IgM Anticorpos anti - <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> IgG +IgG (LCR) Anticorpos anti - <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> IgM +IgM (LCR) Anticorpos anti - Parvovirus IgG Anticorpos anti - Parvovirus IgM Anticorpos anti - Sarampo - IgG Anticorpos anti - Sarampo - IgM
VIDAS	Anticorpos anti – <i>Toxoplasma gondii</i> - IgG Anticorpos anti – <i>Toxoplasma gondii</i> – IgM Anticorpos anti – <i>Toxoplasma gondii</i> - Teste de Avidéz IgG Anticorpos anti - Rubéola - IgG Anticorpos anti - Rubéola – IgM Anticorpos anti – Rubéola - Teste de Avidéz IgG Anticorpos anti - Citomegalovirus (CMV) - IgG Anticorpos anti - Citomegalovirus (CMV) - IgM Anticorpos anti - Citomegalovirus (CMV) - Teste de Avidéz
Mago	Anticorpos anti - <i>Rickettsia conorii</i> IgG Anticorpos anti - <i>Coxiella burnetti</i> IgG
Analyser	Anticorpos anti - Adenovirus - IgG e IgM
Virclia	Anticorpos anti - Parotidite epidémica IgG Anticorpos anti - Parotidite epidémica IgM Anticorpos anti - <i>Rickettsia conorii</i> IgG Anticorpos anti - <i>Rickettsia conorii</i> IgM Anticorpos anti - <i>Coxiella burnetti</i> IgG Anticorpos anti - <i>Coxiella burnetti</i> IgM Anticorpos anti - Vírus <i>Zika</i> IgG Anticorpos anti - Vírus <i>Zika</i> IgM Anticorpos anti - <i>Dengue</i> IgG Anticorpos anti - <i>Dengue</i> IgM Anticorpos anti - Vírus <i>Chikungunya</i> IgG Anticorpos anti - Vírus <i>Chikungunya</i> IgM Anticorpos anti - <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgG Anticorpos anti - <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgM Anticorpos anti - <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgG Anticorpos anti - <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgM Anticorpos anti - Sífilis IgM Anticorpos anti - <i>Bartonella henselae</i> IgG Anticorpos anti - <i>Bartonella henselae</i> IgM Anticorpos anti - Hidatidose IgG Anticorpos anti - <i>Leishmania</i> IgG + IgM
Immunomat	Anticorpos anti - <i>Leptospira</i> - IgG e IgM Anticorpos anti - Echovirus - IgG e IgM Anticorpos anti - Coxsackie virus - IgG e IgM Anticorpos anti – Enterovirus