

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Infeção congénita pelo vírus Zika: mecanismos patogénicos envolvidos

Sofia Alexandra Abranches Matias

Relatório de estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira e
coorientado pela Dra. Maria João Sousa

Mestrado em Análises Clínicas

2023

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Infeção congénita pelo vírus Zika: mecanismos patogénicos envolvidos

Sofia Alexandra Abranches Matias

Relatório de estágio orientado pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo
Pereira e coorientado pela Dra. Maria João Sousa

Mestrado em Análises Clínicas

2023

Agradecimentos

Venho desta forma expressar o meu agradecimento à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, aos docentes que lecionaram nesta edição do Mestrado em Análises Clínicas, por todos os conhecimentos transmitidos, e aos colegas que me acompanharam nestes dois anos, pelo companheirismo que demonstraram em todas as etapas.

Agradeço também à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, a todos os docentes e discentes que me acompanharam na Licenciatura em Bioquímica e que compartilharam o seu conhecimento, que em tanto me foi útil durante estes dois últimos anos e que certamente o será para todo o meu percurso profissional.

Deixo uma palavra de agradecimento ao Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira, meu orientador, por se ter mostrado sempre disponível para me acompanhar na realização desta dissertação e por tornar esta jornada mais leve. Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga, na pessoa do diretor de serviço Dr. Aurélio Mesquita, por me ter recebido, à minha coorientadora, Dra. Maria João Sousa, por ter aceitado guiar-me durante o meu estágio, e a todos os profissionais das diferentes áreas que foram incansáveis e me fizeram sentir em casa.

Como não poderia deixar de ser, agradeço profundamente aos meus pais, pelos sacrifícios que fizeram, pelo apoio que me deram e porque sem eles nada disto seria possível, ao meu irmão, que está sempre lá quando preciso e que desvaloriza todas as minhas preocupações porque acredita cegamente em mim, e ao Dr. José Filipe Melo, porque sem ele tudo seria mais difícil, ou pelo menos mais tedioso.

Por fim, a todos os familiares e amigos que estiveram lá para me apoiar e que acreditaram e acreditam sempre em mim, muito obrigada!

Resumo

O presente relatório de estágio refere-se ao estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas ministrado pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, tendo sido realizado no serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga. Este estágio abrangeu as áreas da Química Clínica, Imunologia, Microbiologia, Hematologia e Biologia Molecular e teve a duração de 750 horas. O seu objetivo é dar a conhecer as atividades por mim desenvolvidas e os conhecimentos adquiridos neste período de estágio. Assim, para cada uma das valências são mencionados os equipamentos com que contactei e as técnicas utilizados durante o meu período de estágio, bem como atividades desenvolvidas para além dos objetivos do estágio.

Palavras-chave: Química Clínica, Imunologia, Microbiologia, Hematologia e Biologia Molecular

Abstract

This internship report was carried out within the curricular internship of the master's degree in Clinical Analyses taught by the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon, have been carried out in the Clinical Pathology service of the Braga Hospital. This internship covered the areas of Clinical Chemistry, Immunology, Microbiology, Hematology and Molecular Biology and lasted 750 hours. This report objective is to give knowledge about the place where I performed my curricular internship, as well as the activities developed by me in this internship. Thus, for each of the valences are mentioned the equipment and techniques used during my internship period, as well as activities developed beyond the objectives of the internship.

Keywords: Clinical Chemistry, Immunology, Microbiology, Hematology and Molecular Biology

Índice

Prefácio	Erro! Marcador não definido.
Agradecimentos	3
Índice.....	4
Índice de Figuras	8
Índice de Tabelas.....	10
Índice de Equações	10
Resumo.....	4
Abstract	5
Siglas e abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	14
1.1. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica.....	14
1.1.1. Missão	15
1.1.2. Visão	15
1.1.3. Valores e Princípios.....	16
1.2. Fluxograma geral ⁽¹⁾	16
2. Receção e Triagem de amostras.....	17
2.1 Receção administrativa de amostras.....	17
2.2 Triagem de amostras	18
2.3 Gasimetrias	18
3. Amostras inadequadas para análise.....	20
4. Valência de Química Clínica	21
4.1. Atellica Solution Analyzer® – Siemens Healthineers.....	22
4.1.1. Toxicologia e drogas terapêuticas.....	22
4.1.2. Química geral.....	26
4.1.3. Proteínas Específicas	41
4.2. Altino Max AX-4030® - Arkray	44
4.3. Sedimax® – Menarini diagnostics	44
4.4. Aution Max AX-4280® - Arkray.....	45
4.5. Capillarys 2® - Sebia	45
4.6. Técnicas Manuais	46
5. Valência de Imunologia	49
5.1. Zenit UP® + Zenit G-Sight®	50
5.1.1. Autoimunidade	50
5.2. Microscópio de fluorescência.....	54
5.3. Zenit RA®	55
5.4. Dynex DSX Best 2000®.....	59
5.4.1. Autoimunidade	59
5.4.2. Serologia infecciosa	60
5.4.3. Outros testes	61
5.5. Auto-LIA™ II®.....	62
5.5.1. Autoimunidade	62
5.5.2. Serologia Infecciosa	64
5.6. LIAISON® e LIAISON XL®	67
5.6.1. Serologia Infecciosa	68
5.7. Cytomics FC500®.....	71
5.9. Técnicas manuais.....	74
5.9.1. Aglutinação e Hemaglutinação	74

5.9.2.	Imunocromatografia	77
6.	Valência de Hematologia	78
6.1.	Sysmex CS-2500®	79
6.2.	Sysmex XN-2000®	82
6.2.1.	Leucócitos (WBC)	83
6.2.2.	Eritrócitos (RBC)	84
6.2.3.	Plaquetas (PLT)	86
6.3.	Ves matic 30®	87
6.3.1.	Velocidade de Sedimentação (VS)	87
6.4.	Adams A1c HA-8180T®	88
6.4.1.	Hemoglobina glicada	88
6.4.2.	Variantes da hemoglobina (HPLC)	88
6.5.	Citocentrífuga Shandoai Cytospin 3®	89
6.6.	Outras técnicas	89
6.6.1.	Análise do esfregaço de sangue periférico	89
6.6.2.	<i>Pesquisa de eosinófilos</i>	90
6.6.3.	Antigénio do <i>Plasmodium spp.</i>	90
6.6.4.	<i>Criptococcus neoformans</i>	91
6.6.5.	<i>Crioglobulinas</i>	91
6.6.6.	Fragilidade osmótica	91
6.6.7.	<i>Pesquisa de cristais</i>	91
7.	Valência de Biologia Molecular	92
7.1.	KingFisher Flex®	93
7.2.	Magna Pure 24®	93
7.3.	LightCycler 480 II®	94
7.4.	QuantStudio™ 5®	94
7.5.	Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler®	95
7.6.	SeqStudio™ Genetic®	95
7.7.	Cobas 480 System®	95
7.7.1.	Citomegalovírus	96
7.8.	LightCycler® 2.0	96
7.8.1.	Vírus Varicela Zóster	97
7.8.2.	Vírus Herpes Simplex	97
7.8.3.	Lactase	97
7.8.4.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	97
7.8.5.	Mutações do gene HFE	98
8.	Valência de Microbiologia	99
8.1.	Bacteriologia	100
8.1.1.	Exame Microscópico	100
8.1.2.	Exame cultural	101
8.1.3.	MALDI Biotyper® sirius IVD System	102
8.1.4.	VITEK® 2 System	102
8.1.5.	Testes imunocromatográficos	103
8.1.6.	Rastreios Microbiológicos	104
8.2.	Micologia	104
8.2.1.	Exame Microscópico	105
8.2.2.	Exame cultural	105
8.3.	Parasitologia	105
8.3.1.	Exame Microscópico	105
8.4.	Virologia	105

8.4.1.	Finnish mariPOC®	106
8.4.2.	GeneXpert® XVI.....	106
8.4.3.	Testes imunocromatográficos	106
8.5.	Micobacteriologia	107
8.5.1.	Exame Microscópico	107
8.5.2.	Exame Cultural	107
8.5.3.	BD BACTEC™ MGIT™ 960.....	108
8.5.4.	Testes imunocromatográficos	108
8.5.5.	Estudos genéticos.....	108
9.	Controlo de qualidade.....	110
9.1.	Controlo de Qualidade Interno	110
9.2.	Avaliação Externa da Qualidade.....	111
Resumo.....	Erro! Marcador não definido.	
Abstract	Erro! Marcador não definido.	
Siglas e Abreviaturas	Erro! Marcador não definido.	
1.	Introdução.....	114
2.	Vírus Zika.....	116
3.	Mecanismos de transmissão.....	118
3.1.	Transmissão vetorial.....	118
3.2.	Transmissão sexual	119
3.3.	Transmissão placentária	120
4.	Infeção congénita pelo vírus Zika – mecanismos patogénicos	121
4.1.	Infeção placentária	123
4.2.	Infeção neurológica fetal	124
5.	Infeção congénita pelo vírus Zika – manifestações clínicas.....	126
5.1.	Alterações morfológicas do crânio	126
5.2.	Anomalias cerebrais	127
5.3.	Anomalias oculares.....	127
5.4.	Anomalias motoras	128
6.	Deteção e diagnóstico laboratorial do ZIKV	129
7.	Sequelas e prognóstico	131
8.	Tratamento e Prevenção	133
8.1.	Vacinas	133
9.	Falhas de conhecimento e pesquisas futuras	136
10.	Materiais e métodos	137
11.	Conclusão	138
12.	Referências bibliográficas.....	139

Índice de Figuras

Figura 1 - Equipamento RapidLab 1265® da Siemens, para a realização de gasimetrias (2). **Erro! Marcador não definido.1**

Figura 2 - Equipamento Atellica Solution Analyzer®, que permite a determinação da concentração de vários parâmetros químicos, a partir de métodos colorimétricos, eletroquímicos e de imunoensoai... 22

Figura 3 - Equipamento Aution Max AX-4030® que permite a análise sumária de urinas. 44

Figura 4 - Equipamento Sedimax®, que se encontra em linha com o Aution Max AX-4030®, e que permite a análise automática do sedimento urinário. 44

Figura 5 - Equipamento Aution Max AX-4280®, que permite a análise sumária de urinas. 45

Figura 6 - Equipamento Capillary 2® da casa comercial Sebia, que permite a realização de eletroforeses de proteínas, imunoeletroforeses e imunofenotipagem, por eletroforese capilar. 45

Figura 7 - Equipamento Zenit UP® que realização ensaios por imunofluorescência(8).	50
Figura 8 - Equipamento Zenit G-Sight®, que permite a análise e reconhecimento de padrões em lâminas de imunofluorescência indireta(9).	50
Figura 9 - Lâmina ZENIT-AmiDot® com 4, ou 8 poços que contém um painel específico de até 38 anticorpos diferentes quantificados em duplicado ⁽¹⁰⁾	51
Figura 10 - Microscópio de fluorescência Motic BA410®, que permite a deteção de padrões de fluorescência(12).	54
Figura 11 - Exemplo de esfregaço corado de sémen com presença de espermatozoides com defeitos de cabeça, peça intermédia e cauda.	55
Figura 12 - Equipamento Zenit RA responsável pela deteção de autoanticorpos por quimioluminescência(13).	55
Figura 13 - Equipamento Dinex Best 2000® para realização de ELISA para deteção de autoanticorpos(14).	59
Figura 14 - Equipamento Auto-LIATMII® da Fujirebio, que permite a realização de ensaios imunoenzimático(15).	62
Figura 15 - Exemplo de tira de teste, para deteção de anticorpos anti-Borrelia spp., com legenda das bandas correspondentes.	64
Figura 16 - Exemplo de tira de teste, para deteção de antigénios do VIH, com legenda das bandas correspondentes.	65
Figura 17 - Exemplo de tira de teste para deteção de VHC, com legenda das bandas correspondentes.	65
Figura 18 - Exemplo de tira de teste para a deteção de Leishmania por westernblot positiva.	66
Figura 19 - Exemplo de tira de teste para a deteção de Toxocara canis por Westernblot positiva.	67
Figura 20 - Equipamento LIAISON® da DiaSorin para a realização de ensaios por quimioluminescência(16).	67
Figura 21 - Equipamento LIAISON XL® da DiaSorin para a realização de ensaios por quimioluminescência ⁽¹⁶⁾	67
Figura 22 - Equipamento Cytomics FC500®, da Beckman Coulter, utilizado para realização de citometria de fluxo(17).	71
Figura 23 - Equipamento Quantum Blue® da Buhlmann que permite a quantificação de bandas em cassetes de imunocromatografia(18).	72
Figura 24 - Exemplo de cassete de imunocromatografia com amostra positiva para o doseamento do Infiximab.	73
Figura 25 - Exemplo de cartão com reação de Wright negativa (à esquerda) e positiva (à direita). ...	75
Figura 26 - Cartão de aglutinação com partículas de carvão RPR com amostra positiva ao título 1/64.	76
Figura 27 - Cartão de teste por imunocromatografia para o diagnóstico de Mycoplasma	77
Figura 28 - Equipamento Sysmex CS-2500 da casa comercial SIEMENS Healthineers, analisador do estudo da coagulação(19).	79
Figura 29 - Equipamento Sysmex XN-2000 da casa comercial Sysmex, que realiza a análise da fração eritrocitária, leucocitária e plaquetária.	82
Figura 30 - Gráfico exemplificativo do diferencial leucocitário realizado pelo Sysmex XN-2000, com áreas para as diferentes populações celulares.	83
Figura 31 - Gráfico de dispersão dos reticulócitos com base na luz dispersa frontalmente em função da luz fluorescente lateral e que permite a distinção dos eritrócitos imaturos ⁽²¹⁾	85
Figura 32 - Gráfico de distribuição da luz dispersa frontalmente pelas plaquetas, em função da luz fluorescente lateral.	87
Figura 33 - Equipamento Ves matic 30 da DIESSE para determinação da velocidade de sedimentação.	87
Figura 34 - Equipamento Adams A1c HA-8180T da ARKRAY utilizado no estudo da hemoglobina glicada e outras variantes de hemoglobina.	88
Figura 35 - Citocentrífuga Shandoar Cytospin 3 da ThermoScientific para a realização de citoesfregaços.	89
Figura 36 - Equipamento KingFisher Flex®, da ThermoFisher Scientific, para extração e purificação dos ácidos nucleicos.	93

Figura 37 - Equipamento Magna Pure 24®, da Roche, para extração e purificação de ácidos nucleicos.	93
Figura 38 - Equipamento LightCycler 480 II®, da Roche, para realização de PCR em tempo real. ...	94
Figura 39 - Equipamento QuantStudio™ 5®, da ThermoFisher Scientific, para realização de PCR em tempo real.	94
Figura 40 - Equipamento Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler®, da ThermoFisher Scientific, para realização de PCR.	95
Figura 41 - Equipamento SeqStudio Genetic®, da ThermoFisher Scientific, para realização de eletroforese capilar.	95
Figura 42 - Sistema Cobas® 4800, da Roche, constituído por dois equipamento Cobas p 480® (à esquerda) e Cobas z 480® (à direita).	95
Figura 43 - Equipamento LightCycler® 2.0, da Roche, para realização de PCR e RT-PCR.	96
Figura 44 - Equipamento MALDI Biotyper®, da Bruker, para a identificação de microrganismos, através da técnica de MALDI-TOF.	107
Figura 45 - Equipamento VITEK® 2, da Biomérieux, para identificação de microrganismos e realização de TSA.	107
Figura 46 - Exemplo de placa de agar com discos , para realização do teste de Kirby-Bauer.	108
Figura 47 - Exemplo de placa de agar com tira de E-teste.	108
Figura 48 - Equipamento Finnish mariPOC, da ArcDia, utilizado para deteção antigénica de vírus respiratórios.	111
Figura 49 - Equipamento GeneXpert® XVI, da Cepheid, para deteção de vírus respiratórios e rastreios microbiológicos, através de PCR.	111
Figura 50 - Equipamento BD BACTET MGIT 960, para incubação, monitorização do crescimento e teste de sensibilidade a fármacos de micobactérias.	113
Figura 51 - Via de entrada do vírus Zika nas células e vias de produção de interferões e ativação de genes estimulados pelos interferões (ISGs).	130
Figura 52 – Mecanismos de piroptose induzida pelo RNA viral do vírus Zika.	132

Índice de Tabela

Tabela 1 - Valores de referência para adulto dos parâmetros medidos numa gasimetria ⁽²⁾	19
Tabela 2 - Valores utilizados para a determinação da presença, ou ausência, de anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA) ⁽¹¹⁾	51
Tabela 3 - Pontos atribuídos a cada linha visível na tira de teste, para deteção de anticorpos anti-Borrelia spp.	64
Tabela 4 - Resultados possíveis para o teste do Treponema pallidum.....	76
Tabela 5 - Valores de referência das populações leucocitárias nas amostras analisadas no Sysmex XN-2000.....	83
Tabela 6 - Programas de avaliação externa da qualidade em que o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga se encontra a participar	111
Tabela 7 - Tipos de vacinas contra o vírus Zika, em diferentes fases dos ensaios clínicos.....	134

Índice de Equações

Equação 1 - Equação que permite a determinação da concentração de colesterol LDL, com base nas concentrações do colesterol total, colesterol HDL e triglicéridos.....	32
--	----

Siglas e abreviaturas

ADA – Adenosina desaminase	IG – Granulócitos Imaturos
ADP – Difosfato de adenosina	IMT – Tecnologia de multissensores integrados
AEQ – Avaliação Externa da Qualidade	IP – Fosfato inorgânico
ALP – Fosfatase alcalina	IPF – Fração das plaquetas imaturas
ALT – Alanina aminotransferase	IRC – Insuficiência Renal Crônica
ANA – Anticorpos antinucleares	IRF – Fração dos reticulócitos imaturos
ANCA – Anticorpos anti citoplasma dos neutrófilos	GPL – Unidades fosfolipídicas IgG (1 µg de anticorpo IgG)
APTT – Tempo de tromboplastina parcial ativada	HbA1 – Hemoglobina A1
ASCA – Anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae	HbA1c – Hemoglobina glicosilada
AST – Aspartato Aminotransferase	HbA2 – Hemoglobina A2
ATP – Trifosfato de adenosina	HbS – Hemoglobina S
BASO – Basófilos	HbC – Hemoglobina C
BCG – Verde de bromocresol	HbF – Hemoglobina fetal
BTC – Butiriltiocolina	hCG – Gonadotrofina coriônica humana
CMV – Citomegalovírus	HCO₃⁻ – Ião bicarbonato
CK – Creatina cinase	HCT – Hematócrito
CK-MB – Isoenzima cardíaca da creatina cinase	HDL – Lipoproteínas de alta densidade
CQI – Controlo de Qualidade Interno	HGB – Hemoglobina
CRE – Enterobacteriales resistentes aos carbapenemos	HIL – Hemólise, icterícia e lipémia
ctCO₂ – Concentração total de dióxido de carbono no sangue	HLA – Antígenos leucocitários humanos
CTFF – Capacidade Total de Fixação do Ferro	HPLC – Cromatografia líquida de alto rendimento
DGGMR – 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) (substrato cromogéneo da lipase)	HSV – <i>Vírus Herpes Simplex</i>
DMAE – Éster dimetil de acridina	LA – Anticoagulante Lúpico
DNA – Ácido desoxirribonucleico	LBA – Lavado broncoalveolar
dsDNA – DNA de dupla hélice	LCR – Líquido cefalorraquidiano
DTNB – 2-ácido nitrobenzóico	LD – Lactato desidrogenase
EBNA – Antígeno nuclear para o <i>virus Epstein-Barr</i>	LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
K3EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético	LYMPH – Linfócitos
EGTA – Ácido Egtazic	MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
ELISA – Ensaio de ImunoAbsorção Enzimática	MCH – Hemoglobina corpuscular média
ENA – Anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis	MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média
EO – Eosinófilos	MCV – Volume corpuscular médio
EUCAST – Comité Europeu de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana	MN – Células Mononucleares
FITC – Fluoresceína	MONO – Monócitos
IFI – Imunofluorescência indireta	MPO – Mieloperoxidase
	MPV – Volume plaquetário médio
	MRSA – <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes
	NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
	NADH – nicotinamida adenina dinucleótido reduzido

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NEQAS – Serviço de Avaliação Externa da Qualidade do NHS
NEUT – Neutrófilos
NRBC – Eritrócitos nucleados
NT-proBNP – Fragmento N-terminal do péptido natriuréticos cerebral
P5P – Piridoxal-5'-fosfato
pCO₂ – Pressão parcial do dióxido de carbono
PCR – Reação de polimerase em cadeia
PETINIA – Técnica de imunoensaio de inibição turbidimétrica melhorada por partículas homogêneas
PLT – Plaquetas
PMN – Células polimorfonucleares
pO₂ – Pressão parcial do oxigênio
PR – Partículas sintéticas gentamicina
PR3 – Proteinase 3
PT – Tempo de Protrombina
RIQAS – Serviço Internacional de Avaliação Externa da Qualidade da Randox
RBC – Eritrócitos
RDW – Índice de distribuição dos eritrócitos
RET – Reticulócitos
RET-He – Conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos
Rpm – Rotações por minuto
RPR – Reagina Plasmática Rápida
SAFLAS – Algoritmo de Sinalização Adaptativa *Sysmex* baseado no reconhecimento de Forma
SFL – Luz dispersa frontalmente
SNPs – Polimorfismos de um único nucleótido
SSC – Luz dispersa lateralmente
TNB – 5-tio-2-nitrobenzoato
TSA – Teste de suscetibilidade aos antibióticos
VIH – *Vírus da Imunodeficiência Humana*
VHC – *Vírus da Hepatite C*
VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade
VS – Velocidade de Sedimentação
VWF – Fator de *Von Willebrand*
WBC – Leucócitos
γGT – Gama glutamil transferase

Parte I

1. Introdução

O presente relatório de estágio tem como principal objetivo a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos no decorrer do Mestrado em Análises Clínicas, bem como a aquisição de competências técnicas e a correlação dos conhecimentos teóricos previamente adquiridos e estas técnicas.

Assim sendo, engloba uma apresentação do local onde decorreu o estágio, a identificação das metodologias utilizadas na determinação de diversos analitos, as características das diferentes valências que fizeram parte do estágio realizado, bem como a importância do controlo de qualidade interno (CQI) e da avaliação externa da qualidade (AEQ) na rotina do laboratório. Encontra-se ainda informação sobre os produtos biológicos necessários para cada análise, os equipamentos utilizados e o desenvolvimento de técnicas manuais.

O estágio curricular efetuado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas teve lugar no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga, entre o dia 15 de março de 2022 e o dia 26 de agosto de 2022, num total de 750 horas, tendo compreendido as áreas de Química Clínica, Imunologia, Hematologia, Microbiologia e Biologia Molecular, e tendo sido orientado pela Dra. Maria João Filipe de Sousa.

1.1. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica

O Serviço de Patologia Clínica é dirigido pelo Dr. Aurélio Mesquita, Médico Patologista Clínico, que na qualidade de diretor de serviço, dirige toda a equipa multidisciplinar de médicos, farmacêuticos e biólogos. A equipa de técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica, bem como os assistentes operacionais são coordenados pela Técnica Superior Catarina Rebelo.

O Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga dedica-se ao diagnóstico de doenças através da análise laboratorial e encontra-se localizado em meio hospitalar, respondendo às necessidades do internamento, das consultas externas, da central de colheitas, do hospital de dia, do bloco operatório, da cirurgia de ambulatório e do serviço de urgência do Hospital de Braga. Assim sendo, este funciona em regime permanente, garantindo uma resposta eficaz a todos os tipos de utentes, tendo um horário de rotina, de segunda a sexta-feira entre as 8:30 e as 16:30, e um horário de urgência todos os dias, 24 horas por dia.

O Hospital de Braga, onde se encontra integrado o Serviço de Patologia Clínica, é o hospital público de referência nos distritos de Braga e Viana do Castelo, conta com 704 camas e presta cuidados de saúde a cerca de 1,2 milhões de utentes. As suas instalações têm 3312 colaboradores que se distribuem pelas áreas da assistência médica, investigação e ensino universitário, sendo que 68 são colaboradores do serviço de Patologia Clínica.

A equipa de profissionais do serviço de Patologia Clínica é constituída por Médicos Patologistas Clínicos (9), Médicos internos de formação específica (5), Farmacêuticos (4), Técnicos Superiores de Saúde (2), Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (39), Assistentes Técnicos (5) e Assistentes Operacionais (4)⁽¹⁾.

1.1.1. Missão

O Hospital de Braga tem como missão prestar cuidados de saúde de excelência, através de uma prática caracterizada pela qualidade, competência, rigor, eficiência e diferenciação, fortalecendo o princípio da humanização e envolvimento com a comunidade, e promovendo simultaneamente a valorização pessoal e técnica dos seus colaboradores.

Paralelamente, incentiva o ensino e fomenta a investigação, em estreita colaboração com instituições universitárias, nas várias vertentes das ciências da saúde.

O serviço de Patologia Clínica tem como missão própria assegurar a realização de exames laboratoriais nas áreas da Hematologia, Química Clínica, Imunologia, Microbiologia e Biologia Molecular, com qualidade e celeridade, acompanhando de forma eficaz a atividade assistencial do Hospital de Braga e, prestando apoio no diagnóstico precoce, prognóstico e monitorização das diferentes patologias e situações clínicas, na instituição de terapêuticas eficazes e na avaliação e monitorização da resposta terapêutica⁽¹⁾.

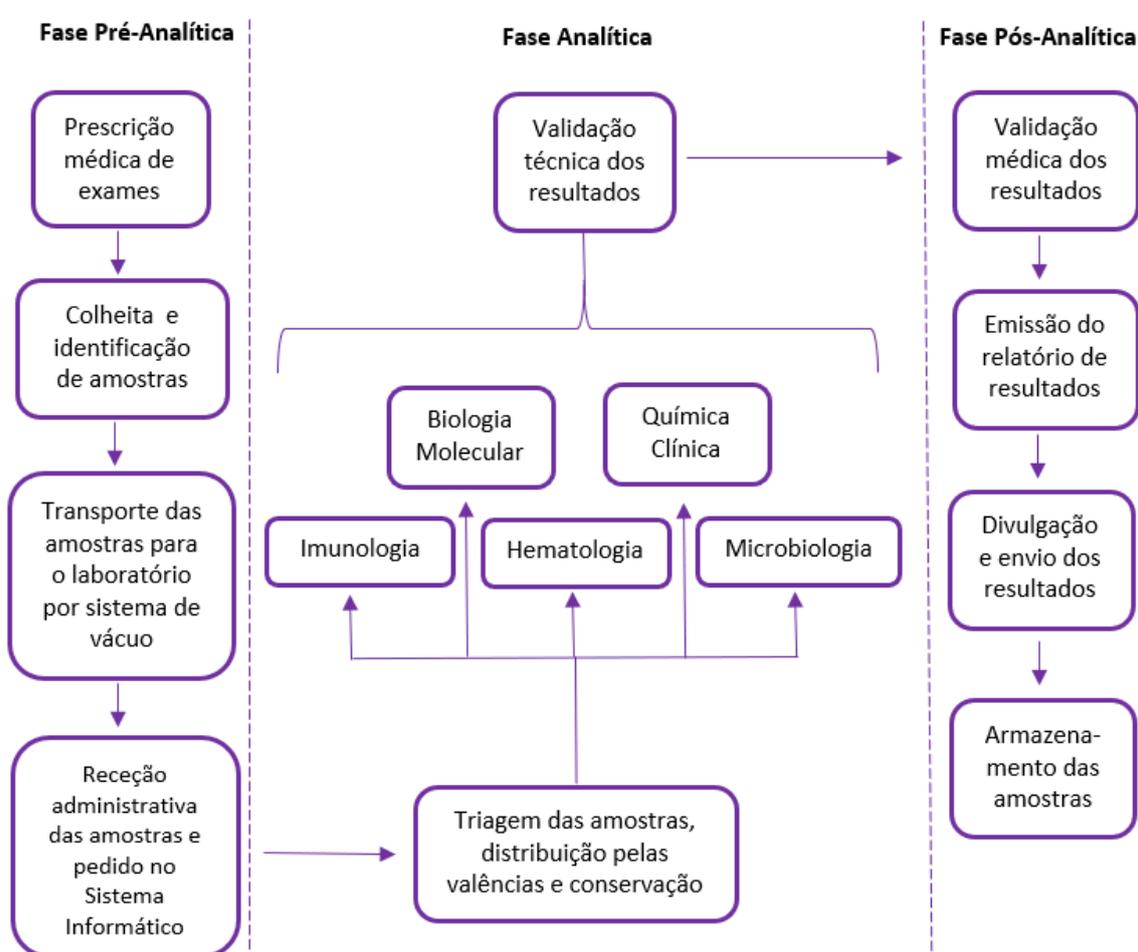
1.1.2. Visão

O Hospital de Braga tem como visão ser uma referência na prestação de cuidados em saúde em Portugal, assente nas melhores práticas clínicas e na inovação, promovendo o desenvolvimento sustentado, a par de uma relação de excelência com os seus utentes, familiares e profissionais⁽¹⁾.

1.1.3. Valores e Princípios

O Hospital de Braga tem como valores: respeito; desenvolvimento humano; competência; responsabilidade; paixão; compromisso; e inovação. Simultaneamente, tem como princípios: o respeito pela dignidade humana e orientação com foco no utente; o talento, formação, multidisciplinaridade e trabalho em equipa; uma cultura de gestão e prática assistencial centradas em elevados padrões éticos; a promoção da saúde na sociedade e envolvimento na comunidade; o fomento de práticas de sustentabilidade, nomeadamente ambiental; a eficiência no uso dos recursos e probidade na conduta⁽¹⁾.

1.2. Fluxograma geral⁽¹⁾



2. Receção e Triagem de amostras

Atividades acompanhadas no período de estágio:

Registo da receção de amostras pelo Laboratório

Divisão entre a triagem geral e a triagem de microbiologia

Triagem das amostras para as diferentes valências

Centrifugação e preparação de alíquotas

Número de análises realizadas pelo Serviço de Patologia em 2022:

3 168 270

Número de doentes que utilizaram o Serviço de Patologia Clínica em 2022:

568 393

A receção e triagem das amostras estão englobadas na fase pré-analítica, fase onde ocorrem a grande maioria dos erros laboratoriais. É nesta fase que também se insere a preparação dos utentes e a colheita das amostras. Para minimizar estes erros existem protocolos que eliminam variações introduzidas pelo ser humano e que permitem a standartização dos procedimentos dentro do laboratório.

No caso do serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga, a preparação dos doentes, bem como a colheita das amostras, não é realizada no mesmo espaço físico onde se encontra o laboratório, podendo as amostras serem provenientes dos vários serviços do hospital, ou da central de colheitas, que se localiza noutra área do hospital. Assim sendo, tive a oportunidade de visitar a Central de Colheitas, porém não fez parte do meu estágio a permanência na mesma.

2.1 Receção administrativa de amostras

Para que as amostras entrem no laboratório é necessária a passagem pelo setor de receção de pedidos e amostras. Este setor, composto por 3 assistentes técnicos, assegura a introdução das prescrições médicas no sistema informático (Clinidata), confirma a receção de todas as amostras necessárias para a realização das análises prescritas, identifica as amostras com códigos de barras (se não vierem do local de origem já com código de barras) e distribui as amostras entre a triagem geral e a triagem da microbiologia⁽¹⁾.

2.2 Triagem de amostras

Após a receção, as amostras vão ser triadas. Sendo o setor da triagem que realiza a triagem, o processamento, a conservação, o tratamento e a alíquotagem das amostras recebidas e procede ao encaminhamento das amostras e alíquotas para as diferentes áreas laboratoriais da fase analítica.

O processamento das amostras prende-se com a centrifugação dos tubos, a fim de separar o plasma, ou soro, dos restantes componentes celulares sanguíneos, a 3500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos e a medição do volume das amostras de urina a tempo determinado, para a execução de cálculos, por exemplo, no caso da clearance da creatinina. Após o processamento das amostras, são realizadas as alíquotas necessárias e distribuídas pelas diferentes valências manualmente⁽¹⁾.

Para além do processo inicial de triagem e do processamento das amostras, esta área é responsável pela receção dos tubos após a realização das análises na área da Química Clínica, procedendo à verificação da realização das mesmas e posterior arquivamento. O arquivamento das amostras é feito de forma semelhante em todas as áreas devendo ser inserido no sistema informático (*Clinidata*) o número do frigorífico, da bandeja e da posição ocupada por cada tubo (linha e coluna), permitindo que, em caso de necessidade, o acesso às amostras seja fácil e intuitivo. Este arquivo de amostras tem uma duração de uma semana, sendo necessária a libertação das bandejas ao final deste tempo.

2.3 Gasimetrias

Este setor é ainda responsável pela realização das gasimetrias provenientes dos serviços hospitalares que não possuem unidades próprias para a sua realização. As gasimetrias são análises de cariz urgente, pois sofrem alterações significativas com o passar do tempo, e, por isso, são processadas com a maior brevidade possível. O seu processamento faz-se em 2 equipamentos RapidLab 1265[®] da Siemens, que permitem a determinação do pH, pCO₂, pO₂, ctCO₂, ctO₂,



Figura 1 - Equipamento RapidLab 1265[®] da Siemens, para a realização de gasimetrias (2).

Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, gap aniónico, glucose, lactato, ião bicarbonato, excesso de base, hematócrito e de frações da hemoglobina (hemoglobina total, oxihemoglobina, desoxihemoglobina, metahemoglobina, carboxihemoglobina e sulfohemoglobina), podendo ser realizadas em sangue arterial, ou venoso.

As determinações realizadas no RapidLab 1265[®] baseiam-se em eletroquímica, que consiste na medição de corrente numa célula eletroquímica com dois ou mais elétrodos. O mecanismo de reconhecimento molecular faz-se através de sensores concebidos, para medir, de forma seletiva, a atividade de uma determinada substância específica. Sendo que a concentração dessa substância é medida através de potenciometria ou amperometria, dependendo da substância. Existem ainda alguns parâmetros que são obtidos através de cálculos.⁽²⁾

Tabela 1 - Valores de referência para adulto dos parâmetros medidos numa gasimetria⁽²⁾

Parâmetro	Valores de referência	Método utilizado
Equilíbrio Ácido-Base		
pH	7,37 – 7,45	Potenciometria
pCO ₂	35 – 46 mmHg	
HCO ₃ ⁻	21 – 26 mmol/L	Cálculo
ctCO ₂	23 – 28 mmol/L	Cálculo
Eletrólitos		
Na ⁺	135 – 145 mmol/L	Potenciometria
K ⁺	3,6 – 4,8 mmol/L	
Ca ²⁺	1,15 – 1,35 mmol/L	
Cl ⁻	95 – 105 mmol/L	
Hiato aniónico	8 – 16 mmol/L	Cálculo
Metabolitos		
Glucose (sangue capilar)	70 – 100 mg/dL	Amperometria com biosensores
Glucose (plasma venoso)	70 – 115 mg/dL	
Lactato (sangue total/plasma arterial)	< 16 mg/dL	
Lactato (plasma venoso)	4,5 – 20 mg/dL	
Bicarbonato	-	Equação de Henderson-Hasselbach
Nível de oxigénio		
pO ₂	70 – 100 mgHg	Amperometria
Co-oximetria		
Frações da hemoglobina	-	Espetrofotometria

3. Amostras inadequadas para análise

A fase pré-analítica é a principal responsável pelo aparecimento de amostras que não estão em condições de serem analisadas, provocando interferência nos parâmetros que pretendemos determinar. Entre os vários tipos de amostras inadequadas para análise destacamos as amostras:

Hemolisadas – amostras em que houve rutura dos eritrócitos, com libertação do conteúdo intracelular dos mesmos e aparecimento da tonalidade vermelha no soro/plasma;

Ictéricas – amostras com tons amarelos, no soro/plasma, subsequentes a distúrbios hepatobiliares;

Lipémicas – amostras com elevada concentração de lipoproteínas ricas em triglicéridos, que conferem turvação ao soro;

Coaguladas – amostras com formação de coágulo, proveniente, por exemplo, da falta de homogeneização dos tubos após a colheita, ou de uma colheita mais demorada/difícil;

Proporção sangue-anticoagulante errada – amostras em que os tubos com anticoagulante não foram preenchidos com sangue dentro da margem de tolerância indicada pela marca presente no mesmo. Podendo haver pouco anticoagulante para o volume de sangue, ou anticoagulante em excesso. Esta interferência tem particular relevância no estudo da coagulação.

Estas irregularidades podem ter diferente impacto consoante o analito em causa, podendo mesmo ser critério de descarte da amostra e pedido de repetição de colheita. Enquanto as amostras coaguladas e com proporção sangue:anticoagulante errada são à partida descartadas, as amostras com as três primeiras interferências mencionadas (HIL) são avaliadas automaticamente nos auto-analisadores (determinação de índices de hemólise, lipémia e bilirrubinemia, numa escala de 0 a 6), sendo o critério de rejeição da amostra diferente consoante o parâmetro que pretendemos determinar.

4. Valência de Química Clínica

Responsável da área:

Dr. Eurico Castro (Farmacêutico, Assessor Sénior)

Orientador do estágio nesta valência:

Dr. Eurico Castro

Período de estágio:

15 de março a 27 de abril de 2022

Atividades acompanhadas no período de estágio:

Manutenção e calibração de equipamentos

Execução e validação do controlo de qualidade interno (CQI)

Receção das amostras previamente triadas

Avaliação da conformidade de amostras

Processamento de amostras

Execução e apreciação dos resultados obtidos na avaliação externa da qualidade (AEQ)

Validação técnica de resultados

Validação clínica de resultados

Arquivo das amostras analisadas

Gestão de stocks

Número de amostras analisadas no período de estágio:

179 832

A Química Clínica é a área laboratorial que estuda as vias e processos metabólicos do organismo e as alterações inerentes a estes, com vista ao diagnóstico, monitorização e prevenção da doença. É uma área que se encontra em larga escala automatizada e que abrange a maior parte das análises de rotina, sendo realizadas análises a variados tipos de amostra, nomeadamente, soro, plasma, urina (tipo II, aleatória e a tempo determinado), sangue total, LCR (líquido cefalorraquidiano), LBA (lavado bronco-alveolar), cálculos renais, etc.

Atualmente no serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga a área de Química Clínica encontra-se subdividida em Química Geral e Imunoquímica, sendo que o meu estágio incidiu sobre a divisão de Química Geral, tendo tido oportunidade de conhecer, de forma superficial, a divisão de Imunoquímica e o trabalho lá realizado.

4.1. Atellica Solution Analyzer® – Siemens Healthineers

O Atellica® é um equipamento composto por três módulos ligados em cadeia, onde são realizados a maior parte dos parâmetros da Química Geral. No serviço de Patologia Clínica, existem dois equipamentos Atellica®, cada um com um sistema de gestão de amostras, um analisador de química



Figura 2 - Equipamento Atellica Solution Analyzer®, que permite a determinação da concentração de vários parâmetros químicos, a partir de métodos colorimétricos, eletroquímicos e de imunoensaio.

clínica, CH 930, e um analisador de imunoensaio, IM 1300. O analisador Atellica® CH 930 tem um componente fotométrico e um componente com tecnologia de multisensores integrados (IMT). Assim, este conjunto de analisadores consegue determinar um conjunto alargado de parâmetros em diferentes áreas da química⁽³⁾.

A avaliação da conformidade das amostras nos parâmetros HIL é realizada pelo próprio equipamento, que atribui a estes parâmetros índices numa escala de 0 a 6. Cada análise tem descrito, na bula, o índice a partir do qual cada um dos parâmetros passa a ser um interferente.

4.1.1. Toxicologia e drogas terapêuticas

Acetaminofeno

O acetaminofeno, também conhecido como paracetamol, é utilizado como analgésico em diversas fórmulas e está associado a hepato e nefrotoxicidade. O ensaio realizado no Atellica baseia-se na conversão de Acetaminofeno, pela acilamidohidrolase, para produzir p-aminofenol. O p-aminofenol é assim convertido num complexo colorido (5-(4-iminofenol)-8-quinolina) produzido pela reação com 8-hidroxiquinolina-5-ácido sulfónico, na presença de iões de manganês. O aumento da absorvância a 596/805 nm é diretamente proporcional à concentração de acetaminofeno na amostra.

Amostra: soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 0,2 – 20,0 mg/dL (13,2 – 1322,0 µmol/L)

Valores de referência: 1,0 – 2,0 mg/dL (66,0 – 132,0 µmol/L)

concentração tóxica 4h pós-ingestão > 15,0 mg/dL (993,0 µmol/L)

concentração tóxica 12h pós-ingestão > 4,0 mg/dL (265,0 µmol/L)

Interferências: bilirrubina não conjugada, hemólise e lipémia

Ácido valproico

O ácido valproico é um anticonvulsivante, que atua ao nível dos recetores GABA (ácido gama-aminobutírico), no cérebro. A determinação da sua concentração é realizada pela técnica de Imunoensaio de inibição turbidimétrica melhorada por partículas (PETINIA).

Amostra: Soro

Intervalo terapêutico: 50 – 100 µg/mL

Álcool etílico (etanol)

A determinação da concentração do etanol é realizada através de um ensaio enzimático e permite inferir informações sobre a ingestão de bebidas alcoólicas, tendo particular relevância no contexto rodoviário.

Amostra: Soro, plasma ou urina

Amicacina

A amicacina é um antibiótico cuja concentração é determinada através de um método enzimático.

Amostra: Soro ou plasma

<u>Intervalo terapêutico</u> : Infecção leve vale	1 – 4 µg/mL
Infecção leve pico	20 – 25 µg/mL
Infecção grave vale	5 – 8 µg/mL
Infecção grave pico	25 – 30 µg/mL

Cafeína

A determinação da concentração de cafeína faz-se através da técnica de imunoensaio homogéneo, que se baseia na competição entre a cafeína presente no soro e a cafeína marcada com glicose-6-fosfato desidrogenase, pela ligação a um anticorpo monoclonal específico. Esta enzima converte NAD⁺ (Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado) em NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido reduzido) e, uma vez ligada ao anticorpo, diminui a sua atividade. Assim, a alteração da absorvância, a 340 nm, é proporcional à atividade da enzima e à concentração de cafeína na amostra.

Amostra: Soro

Intervalo de medição: 1 – 30 µg/mL (5,2 -155 µmol/L)

Intervalo terapêutico: < 50 µg/mL

Carbamazepina

A técnica utilizada na determinação da concentração da carbamazepina é a PETINIA. As partículas sintéticas com carbamazepina vão competir com a carbamazepina da amostra pela ligação a um anticorpo monoclonal específico da carbamazepina. Assim, a velocidade de agregação é inversamente proporcional à concentração de carbamazepina na amostra, lida a 545 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 0,4 – 20,0 µg/mL (1,7 – 84,7 µmol/L)

Intervalo terapêutico: 4,0 – 12,0 µg/mL (16,9 – 50,8 µmol/L)

Interferências: bilirrubina

Digoxina

A Digoxina é um fármaco antiarrítmico e cardiotônico, cuja concentração é determinada por quimioluminescência direta.

Amostra: Soro

Intervalo terapêutico: 0,9 – 2,0 ng/mL

Interferências: lipémia

Fenobarbital

A técnica utilizada na determinação da concentração do fenobarbital é a PETINIA. As partículas sintéticas ligadas a fenobarbital vão competir com o fenobarbital da amostra pela ligação a um anticorpo monoclonal específico para o fenobarbital. Assim, a velocidade de agregação é inversamente proporcional à concentração de fenobarbital na amostra, lida a 545 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 3,0 – 80,0 µg/mL (12,9 – 344,8 µmol/L)

Intervalo terapêutico: 15,0 – 40,0 µg/mL (64,7 – 172,4 µmol/L)

Interferências: lipémia

Fenitoína

A técnica utilizada na determinação da concentração da fenitoína é a PETINIA. As partículas sintéticas ligadas à fenitoína vão competir com a fenitoína da amostra pela ligação a um anticorpo monoclonal específico para a fenitoína. Assim, a velocidade de

agregação é inversamente proporcional à concentração de fenitoína na amostra, lida a 545 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 2,0 – 40,0 µg/mL (7,9 – 158,4 µmol/L)

Intervalo terapêutico: 10,0 – 20,0 µg/mL (39,6 – 79,2 µmol/L)

Interferências: hemólise, bilirrubina e lipémia

Gentamicina

A metodologia utilizada para a determinação da concentração da gentamicina envolve a técnica PETINIA que utiliza um conjugado de partículas sintéticas ligadas a gentamicina e um anticorpo monoclonal específico para a gentamicina. A gentamicina presente na amostra compete com as partículas pelo anticorpo, diminuindo a velocidade de agregação. Assim, a velocidade de agregação, que pode ser lida a 545 nm, é inversamente proporcional à concentração de gentamicina na amostra.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 0,5 – 12,0 µg/mL (1,1 – 25,9 µmol/L)

Intervalo terapêutico: 4,0 – 10,0 µg/mL (8,64 – 21, µmol/L)

Interferências: bilirrubina

Lítio

A determinação da concentração de lítio é realizada através de um ensaio colorimétrico, sendo que este fármaco é utilizado comumente como agente terapêutico de doenças psiquiátricas.

Amostra: Soro

Intervalo terapêutico: 0,6 – 1,2 mmol/L

Interferências: lipémia

Metotrexato

A concentração de metotrexato é determinada pela técnica de imunensaio enzimático homogêneo, que se baseia na competição para a ligação aos anticorpos, do fármaco presente na amostra e do fármaco sintético marcado com a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. A atividade enzimática diminui após a ligação do anticorpo, pelo que a concentração do fármaco na amostra pode ser medida em termos de atividade enzimática. A enzima ativa converte o NAD⁺ em NADH, resultando numa alteração da absorvância a 340 nm.

Amostra: Soro

Intervalo de medição: 0,1 – 2 $\mu\text{mol/L}$

Intervalo terapêutico: 0 – 5 $\mu\text{mol/L}$ (24h após a toma)

0 – 1 $\mu\text{mol/L}$ (48 após a toma)

Teofilina

A Teofilina está naturalmente presente no cacau e no chá, mas é também um fármaco do grupo dos anti-histamínicos. A concentração deste fármaco é determinada através de turbidimetria.

Amostra: Soro

Intervalo terapêutico: 10 – 20 ug/mL

Vancomicina

A Vancomicina é um antibiótico, sendo que a sua concentração deve ser estudada antes da administração da dose terapêutica (vale) e novamente após 1h do término da perfusão do antibiótico. A determinação da concentração de Vancomicina é realizada através da técnica PETINIA.

Amostra: Soro

Intervalo terapêutico: Crianças 5 – 10 ug/mL

Adultos vale 15 – 20 ug/mL

Adultos pico 25 – 40 ug/mL

Interferências: bilirrubina

4.1.2. Química geral

Ácido úrico

O ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína e peróxido de hidrogénio. É formado um composto colorido a partir do peróxido de hidrogénio, 4-aminofenazona e N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina mediante a influência catalítica da peroxidase. A formação do composto resultante, lida a 545 nm, é proporcional à concentração de ácido úrico.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 0,5 – 20,0 mg/dL (30 – 1190 $\mu\text{mol/L}$)

Urina 0,9 – 180,0 mg/dL (54 – 10710 $\mu\text{mol/L}$)

Valores de referência: Soro/plasma Mulher 3,1 – 7,8 mg/dL (184 – 464 $\mu\text{mol/L}$)

Soro/plasma Homem 3,7 – 9,2 mg/dL (220 – 547 $\mu\text{mol/L}$)

Urina 250 – 750 mg/24h (1,48 – 4,43 mmol/24h)

Interferências: hemólise e bilirrubina

Ácidos biliares totais

Os ácidos biliares totais são determinados através de um método enzimático cíclico, onde há a conversão destes em oxosteroides. Durante a oxidação dos ácidos biliares pela enzima α -3-hidroxiesteroide desidrogenase, ocorre a redução do NAD^+ a NADH. Sendo que a concentração NADH, que pode ser medida a 410 nm, é proporcional à concentração de ácidos biliares presentes na amostra.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio, plasma em heparina de sódio e plasma em K3EDTA

Intervalo de medição: 1,0 – 180 $\mu\text{mol/L}$

Valores de referência: 1,0 – 6,0 $\mu\text{mol/L}$

Adenosina desaminase (ADA)

A determinação da atividade catalítica da ADA faz-se através do kit ADA Liquochem, em canal aberto, e utiliza um método colorimétrico cinético, baseado na ação hidrolítica da ADA sobre a adenosina para formar inosina, que por ação da purina nucleósido fosforilase, a xantina oxidase e a peroxidase dá lugar a um composto colorimétrico (quinoneimina), cuja formação de monitoriza a 545 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 0 – 100 U/L

Valores de referência: 4,8 – 23,1 U/L

Interferências: aumento - hemólise e o tratamento com azatioprina

diminuição - ácido ascórbico, L-cisteína, ácido homogentísico e a bilirrubina

Aldolase

A determinação da atividade da aldolase faz-se através do kit da BEN biochemical enterprise, em canal aberto, na presença do substrato 1,6-bisfosfato-D-frutose e das enzimas triosefosfato isomerase, glicerol-3P-desidrogenase, lactato desidrogenase e por fim aldolase. A aldolase vai converter NADH em NAD^+ , sendo que a diminuição da absorvência correspondente à oxidação do NADH em NAD^+ é proporcional à atividade da aldolase na amostra, a 340 nm.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou plasma em K₃EDTA

Intervalo de medição: 0 – 25 U/L

Valores de referência: 1,2 – 8,8 U/L

Alanina aminotransferase (ALT)

A determinação da alanina aminotransferase (ALT) faz-se através do ensaio Atellica CH Alanina Aminotransferase P5P, que utiliza piridoxal-5'-fosfato como ativador da ALT. Após a ativação da ALT, esta vai catabolizar a reação entre a alanina e o α -quetoglutarato, que vai originar piruvato e L-glutamato. A reação do piruvato com o NADH vai levar a uma diminuição da absorvância, a 340/410 nm, que é proporcional à atividade da ALT.

Amostra: soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 9 – 1000 U/L

Valores de referência: 7 – 40 U/L

Interferências: hemólise e lipémia

Aspartato aminotransferase (AST)

Bem como na determinação da atividade da alanina aminotransferase, também na determinação da aspartato aminotransferase temos um método baseado na reação de ativação da AST com o piridoxal-5'-fosfato. Segue-se a reação iniciada pela adição de α -quetoglutarato como segundo reagente, que origina oxaloacetato e L-glutamato, e por fim a reação do oxaloacetato com o NADH. A concentração de NADH é medida pela respetiva absorvância a 340/410 nm e a velocidade de redução da absorvância é proporcional à atividade da AST.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 8 – 1000 U/L

Valores de referência: 13 – 40 U/L

Interferências: hemólise, bilirrubina e lipémia

Albumina

A Albumina é determinada pelo ensaio Atellica CH Albumin, que se baseia no método de Doumas, Watson e Biggs e utiliza uma solução de verde de bromocresol como corante de fixação. A formação do complexo albumina-BCG é uma reação ponto final a 596/694 nm.

Amostra: soro ou plasma

Intervalo de medição: 1,0 – 6,0 g/dL (10 – 60 g/L)

Valores de referência: 3,2 – 4,8 g/dL (32 – 48 g/L)

Interferências: hemólise

Amônia

A amônia é determinada através de um método enzimático, sendo um componente importante no estudo da função renal.

Amostra: Plasma em heparina de lítio

Valores de referência: 18,7 – 54,5 $\mu\text{mol/L}$

Interferências: hemólise, bilirrubina e lipémia

Amilase

A atividade da amilase é determinada pelo ensaio Atellica CH amylase_2, que tem por base o desbloqueamento do p-nitrofenil-maltoheptósido bloqueado por etilideno, seguido do desbloqueamento do p-nitrofenol pela α -glucosidase, que é medido a 410/694 nm. A concentração de p-nitrofenol livre é proporcional á atividade da amilase.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: 20 – 1500 U/L

Valores de referência: Soro e plasma 30 – 118 U/L

Urina \leq 650 U/L

Interferências: lipémia

Bilirrubina direta

O ensaio que permite a determinação da concentração da bilirrubina direta baseia-se num método de oxidação química que utiliza o vanadato como agente oxidante, produzindo biliverdina. A redução da absorvância a 451 nm é proporcional á concentração de bilirrubina direta na amostra.

Amostra: soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 0,1 – 15,0 mg/dL (2 – 256 $\mu\text{mol/L}$)

Valores de referência: \leq 0,3 mg/dL (\leq 5 $\mu\text{mol/L}$)

Interferências: lipémia

Bilirrubina total

A determinação da bilirrubina total inicia-se com a oxidação da bilirrubina pelo vanadato para produzir biliverdina, na presença de um detergente. Esta reação de oxidação provoca a redução na absorvância a 451 nm, de forma proporcional á concentração de bilirrubina total na amostra, tanto a conjugada, como a não conjugada.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 0,15 – 35,0 mg/dL (3 – 599 $\mu\text{mol/L}$)

Valores de referência: < 60 anos 0,3 – 1,2 mg/dL (5 – 21 $\mu\text{mol/L}$)

60 – 90 anos 0,2 – 1,1 mg/dL (3 – 19 µmol/L)

> 90 anos 0,2 – 0,9 mg/dL (3 – 15 µmol/L)

Interferências: lipémia

Bilirrubina indireta

A Bilirrubina indireta é calculada através da subtração da Bilirrubina direta à Bilirrubina total, não tendo uma determinação por qualquer tipo de método instrumental.

Cálcio

Os íons cálcio formam um composto colorido com arsenazo III, que é medido a 658 nm. A quantidade de cálcio presente na amostra é diretamente proporcional à intensidade do composto colorido formado.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 1,0 – 16,0 mg/dL (0,25 – 4,00 mmol/L)

Urina 1,0 – 32,0 mg/dL (0,25 – 8,00 mmol/L)

Valores de referência: Soro e plasma 8,7 – 10,4 mg/dL (2,18 – 2,60 mmol/L)

Urina 24h 100 – 300 mg/24h (2,50 – 7,50 mmol/24h)

Urina aleatória Mulher 0,9-37,9 mg/dL (0,23-9,47 mmol/L)

Urina aleatória Homem 0,5-35,7 mg/dL (0,13-8,92 mmol/L)

Interferências: lipémia

Capacidade Total de Fixação do Ferro

A Capacidade Total de Fixação do Ferro (CTFF) é a concentração máxima de ferro que as proteínas séricas, maioritariamente a transferrina, têm capacidade de transportar. A determinação deste parâmetro realiza-se por espectrofotometria, podendo o complexo formado com o ferro ser lido a 560nm.

Amostra: Soro

Valores de referência: < 2 meses 59 – 175 µg/dL

2meses – 17 anos 250 – 400 µg/dL

> 17 anos 240 – 425 µg/dL

Interferências: bilirrubina e lipémia

Cloro

A determinação da concentração de cloro na amostra faz-se através do IMT que contém quatro eléctrodos, sendo três seletivos para os íons sódio, potássio e cloro e outro usado como eléctrodo de referência. Assim, a amostra é posicionada no sensor e os íons

de cloro vão estabelecer um equilíbrio com a superfície do eletrodo, sendo gerado um potencial proporcional ao algoritmo da atividade do analito na amostra. O potencial gerado na amostra é comparado ao potencial gerado numa solução padrão e a concentração dos iões é calculada pela equação de *Nernst*.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 50 – 200 mmol/L (mEq/L)

Urina 20 – 330 mmol/L (mEq/L)

Valores de referência: Soro e plasma 98 – 107 mmol/L (mEq/L)

Urina 110 – 250 mmol/L/24h (mEq/L/24h)

Cobre

A determinação da concentração sérica do cobre é feita em canal aberto através de uma reação de ponto final, determinada aos 571 nm, onde o cobre que se encontra ligado à ceruloplasmina reage com o 4-(3,5-dibromo-2-piridilaso)-N-etil-N-(3-sulfopropil), formando um composto colorimétrico. O aumento da absorvência é proporcional á concentração de cobre na amostra.

Amostra: plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 17 – 500 µg/dL

Valores de referência: 70 – 155 µg/L

Colesterol HDL

A determinação da concentração de HDL consiste em dois passos. Primeiro, a eliminação de quilomicras, colesterol VLDL e colesterol LDL, através da colesterol esterase e da colesterol oxidase. De seguida, a medição específica do colesterol HDL, após a libertação deste pelo surfactante e inibição da colesterol esterase da primeira reação por azida sódica. A intensidade do corante quinoneimina produzida na reação de Trinder é diretamente proporcional à concentração de colesterol quando medido a 596 nm.

Amostra: Soro e plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 20 – 129 mg/dL (0,52 – 3,34 mmol/L)

Valores desejável: ≥ 60,0 mg/dL (≥ 1,60 mmol/L)

Colesterol LDL

Tal como na determinação da concentração do colesterol HDL, também na determinação da concentração do colesterol LDL existem dois passos. Sendo que no primeiro a colesterol esterase e a colesterol oxidase eliminam o colesterol (exceto o

LDL) e no segundo passo se dá a medição específica do colesterol LDL, após a sua libertação pelo detergente. A intensidade da quinoneimina produzida na reação de Trinder é diretamente proporcional à concentração de colesterol LDL quando medido a 596 nm. Para além da determinação enzimática, este parâmetro pode ser determinado por cálculo, através da Fórmula de *Friedwald*⁽⁴⁾.

Equação 1 - Equação que permite a determinação da concentração de colesterol LDL, com base nas concentrações do colesterol total, colesterol HDL e triglicéridos

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - \left(\text{Colesterol HDL} + \frac{\text{Triglicéridos}}{5} \right)$$

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 5,0 – 1000,0 mg/dL (0,13 – 25,90 mmol/L)

Valores desejáveis: < 129,0 mg/dL (< 3,30 mmol/L)

Interferências: bilirrubina e lipémia

Colesterol Total

Tal como nas técnicas anteriores, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol-esterase em colesterol e ácidos gordos livres, sendo que neste caso não temos o primeiro passo de eliminação de frações. O colesterol é convertido em colest-4-en-3-ona pela colesterol-oxidase, na presença de oxigénio, para formar peróxido de hidrogénio. É formado um composto colorimétrico a partir do peróxido de hidrogénio, da 4-aminoantipirina e do fenol mediante a influência catalítica de peroxidase. A absorvância desse composto colorimétrico, a quinoneimina, é medida como uma reação de ponto final a 505 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 25 – 618 mg/dL (0,65 – 16,01 mmol/L)

Valores desejáveis: < 200 mg/dL (5,18 mmol/L)

Interferências: bilirrubina

Colinesterase

A colinesterase catalisa a hidrólise de butirilticolina (BTC) em butirato e tiocolina, reduzindo 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) para 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). Assim, o aumento da absorvância a 410 nm é proporcional à atividade de colinesterase na amostra.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 1 500 – 30 000 U/L

Valores de referência: 7 000 – 19 000 U/L

Interferências: bilirrubina e lipémia

Creatina Cinase (CK)

A determinação da atividade da creatina cinase faz-se através da reação desta com difosfato de adenosina (ADP) para formar trifosfato de adenosina (ATP). O ATP vai intervir na reação da hexoquinase-G6PD gerando NADPH, sendo que este faz aumentar a absorvência, que pode ser lida a 340 nm.

Amostra: soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 15 – 1300 U/L

Valores de referência: Mulheres 34 – 145 U/L

Homens 46 – 171 U/L

Interferências: hemólise

CK-MB massa

A isoenzima cardíaca da creatina cinase (CK-MB) está presente nas células musculares e é libertada por estas, quando há lesão muscular, sendo por isso utilizada como marcador da lesão cardíaca. A determinação da sua concentração faz-se através de quimioluminescência direta.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 5 ng/mL

Interferências: hemólise

Creatinina

A creatinina é determinada através de espectrofotometria, a 505/571 nm, através do ensaio Atellica CH Crea_2, onde a creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino produzindo um complexo de creatinina picrato avermelhado. Para este ensaio é feita uma correção com branco de amostra, para eliminar a interferência da bilirrubina, e uma correção com diminuição de 0,3 mg/dL, devido à interação de proteínas não específicas. O resultado da creatinina é geralmente acompanhado do cálculo da **clearance de creatinina**, um parâmetro calculado com base nas concentrações de creatinina no soro e na urina e o fluxo urinário.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 0,15 – 30,00 mg/dL (13 – 2652 µmol/L)

Urina 3,00 – 245,00 mg/dL (265 – 21658 µmol/L)

Valores de referência: Soro e plasma – Mulher 0,55 – 1,02 mg/24h (49 – 90 µmol/L)

Homem 0,7 – 1,3 mg/24h (62 – 115 µmol/L)

Urina – Mulher 600 – 1800 mg/24h (5,3 – 15,9 mmol/24h)

Homem 950 – 2490 mg/24h (8,4 – 22,0 mmol/24h)

Interferências: bilirrubina e lipémia

Ferro

O ferro é um mineral importante na ligação do oxigênio à hemoglobina, sendo que um aumento, ou uma diminuição da sua concentração tem implicações hematológicas. A determinação da concentração do ferro faz-se através de uma reação colorimétrica com ferrozina, que é lida a 560nm.

Amostra: Soro ou plasma

<u>Valores de referência:</u> < 1 mês	100 – 250 µg/dL
1 mês – 7 anos	40 – 100 µg/dL
7 anos – 14 anos	50 – 120 µg/dL
> 14 anos Homem	65 – 175 µg/dL
> 14 anos Mulher	50 – 170 µg/dL

Interferências: hemólise e lipémia

Folatos

Os folatos estão envolvidos no desenvolvimento dos eritrócitos e na síntese dos ácidos nucleicos, sendo a determinação da sua concentração feita por quimioluminescência.

Amostra: Soro ou sangue total

Valores de referência: > 5,38 ng/mL

Interferências: hemólise

Fosfatase alcalina (ALP)

A determinação da atividade da fosfatase alcalina é feita através do ensaio Atellica CH Alkaline Phosphatase Concentrated, que se baseia na transfosforilação do p-nitrofenilfosfato a p-nitrofenol, na presença de um tampão de transfosforilação e de íons de magnésio e zinco. A variação da absorvância a 410/478 nm devido à formação de p-nitrofenol é diretamente proporcional à atividade da ALP.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 20 – 1000 U/L

Valores de referência: 46 – 116 U/L

Interferências: lipémia

Fósforo Inorgânico

O fósforo é determinado pelo ensaio Atellica CH Inorganic Phosphorus (IP), que se baseia na reação entre o fósforo inorgânico e o molibdato de amônio, na presença de ácido sulfúrico, que leva à produção de fosfomolibdato não reduzido, que é medido como uma reação de ponto final a 340/658 nm.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 0,3 – 20,0 mg/dL (0,10 – 6,46 mmol/L)

Urina 4,0 – 100,0 mg/dL (1,26 – 32,30 mmol/L)

Valores de referência: Soro e plasma 2,4 – 5,1 mg/dL (0,78 – 1,65 mmol/L)

Urina 0,4 – 1,3 g/24h (12,9 – 42,0 mmol/24h)

Interferências: lipémia

Gama-Glutamil Transferase (γ GT)

A determinação da concentração da γ GT inicia-se com a reação do substrato sintético L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida com a glicilglicina, que atua como recetor do grupo γ -glutamil, sendo libertado 5-amino-2-nitrobenzoato, que tem um máximo de absorção aos 410 nm. Esta reação é catalisada pela γ GT, sendo a absorção a 410 nm proporcional à concentração desta enzima.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 7 – 1200 U/L

Valores de referência: Mulher < 38 U/L

Homem < 73 U/L

Interferências: bilirrubina e lipémia

Glicose

A determinação da glicose faz-se através do método da hexoquinase, que utiliza um reagente de dois componentes. A adição do primeiro reagente, que contém tampão, ATP e NAD, é utilizada para corrigir as interferências das substâncias presentes na amostra, sendo lida uma primeira absorvância após a sua adição. De seguida é adicionado o segundo reagente, que inicia a conversão da glicose com a redução do NAD⁺ a NADH, permitindo a leitura da segunda absorvância a 340 nm. A diferença entre as absorvâncias medidas é proporcional à concentração da glicose.

As determinações da glicose de forma seriada aos 0, 60, 90 e 120 min são utilizadas na realização da **Prova de Tolerância Oral à Glicose**, bem como na **Prova de Tolerância Oral à Lactose**. Na primeira prova, é realizada a ingestão de um

preparado com 75g de glicose, que tem em vista o estudo da Diabetes e da Diabetes Gestacional⁽⁵⁾. No caso da segunda prova, é ingerido um preparado com 50g de lactose e tem como objetivo o estudo da deficiência em Lactase⁽⁶⁾.

Amostra: Soro, líquido cefalorraquidiano (LCR), plasma em heparina de lítio, plasma em K3EDTA com potássio, fluoreto de sódio/oxalato de potássio ou urina.

Intervalo de medição: 4 – 700 mg/dL

Valores de referência: Soro e plasma 74 – 106 mg/dL (4,1 – 5,9 mmol/L)

Urina < 0,5 g/24h (2,8 mmol/24h)

LCR 40 – 70 mg/dL (2,2 – 3,9 mmol/L)

Lactato

O lactato é determinado pelo ensaio Atellica CH Lac_2 que mede o lactato no plasma por meio de um ensaio enzimático. Este ensaio tem como princípio a reação de oxidação do lactato a piruvato e peróxido de hidrogénio, com a formação de um composto colorimétrico capaz de ser medido espectrofotometricamente a 545/694 nm.

Amostra: plasma com heparina de lítio, plasma com fluoreto de sódio, plasma com K3EDTA ou líquido cefalorraquidiano (LCR).

Intervalo de medição: Plasma 0,6 – 110,0 mg/dL (0,07 – 12,21 mmol/L)

LCR 0,9 – 70 mg/dL (0,10 – 7,77 mmol/L)

Valores de referência: Plasma 4,5 – 19,8 mg/dL (0,50 – 2,20 mmol/L)

LCR 5,4 – 19,8 mg/dL (0,60 – 2,20 mmol/L)

Interferências: hemólise e bilirrubina

Lactato desidrogenase

A lactato desidrogenase (LD) catalisa a conversão de L-lactato em piruvato na presença de NAD⁺, sendo a atividade enzimática da LD proporcional à velocidade de produção de NADH. A quantidade de NADH produzida é determinada pela medição do aumento na absorvância a 340 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 14 – 750 U/L

Valores de referência: 120 – 246 U/L

Interferências: lipémia

Lipase

O ensaio Atellica CH Lipase permite a medição da atividade da enzima lipase pela sua reação enzimática, onde o substrato cromogénico da lipase (DGGMR) é clivado

pela ação catalítica desta para formar 1,2-o-dilaurilrac-glicerol e um intermédio instável, que se decompõe espontaneamente em ácido glutárico e metilsorufina. Assim, a atividade da lipase é proporcional à produção de metilsorufina a 571/694 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 8 – 700 U/L

Valores de referência: 12 – 53 U/L

Interferências: hemólise e bilirrubina

Magnésio

O magnésio pode ser determinado pelo ensaio Atellica CH Magnesium, que se baseia na reação do azul de xilidil modificado, onde os íons de magnésio reagem com o azul de xilidil em meio alcalino para formarem um composto roxo-avermelhado solúvel em água, que pode ser medido a 505/694 nm. O cálcio compete pela ligação ao azul de xilidil e por isso sofre complexação com EGTA.

Amostra: soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 0,50 – 5,00 mg/dL (0,21 – 2,06 mmol/L)

Urina 1,00 – 14,00 mg/dL (0,41 – 5,75 mmol/L)

Valores de referência: Soro e plasma 1,60 – 2,60 mg/dL (0,66 – 1,07 mmol/L)

Urina 24 – 255 mg/24h (0,99 – 10,45 mmol/24h)

Interferências: lipémia

Microalbumina

A Microalbumina é a concentração de albumina determinada em amostras de urina para avaliação da função renal e é obtida por turbidimetria.

Amostra: Urina

Valores de referência: 30 – 300 mg/24h

Mioglobina

A Mioglobina é uma proteína de transporte intracelular de oxigénio, utilizada no estudo da lesão muscular e cardíaca. A determinação da concentração desta proteína é realizada por quimioluminescência direta.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 110 ng/mL

NT-proBNP

O fragmento N-terminal do péptido natriuréticos cerebral (NT-proBNP) é libertado em pequenas quantidades quando a atividade cardíaca é normal. Quando temos insuficiência cardíaca há um aumento da concentração deste fragmento, sendo que essa concentração é determinada por quimioluminescência direta.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 75 anos < 125 pg/mL
> 75 anos < 450 pg/mL

Piruvato

A determinação do piruvato é feita em canal aberto, através de um método enzimático, onde a lactato desidrogenase vai catabolizar a reação do piruvato com o NADH (em excesso), produzindo lactato e NAD⁺. A absorvância será lida a 340 nm sendo que esta é inversamente proporcional à concentração de piruvato.

Amostra: sangue total em K3EDTA desproteinizado (com ácido perclórico)

Intervalo de medição: 0,09 – 3,18 mg/dL (0,009 – 0,318 mmol/L)

Valores de referência: 0,3 – 0,8 mg/dL (0,03 – 0,08 mmol/L)

Potássio

A determinação da concentração de potássio na amostra faz-se através do IMT. Assim, a amostra é posicionada no sensor e os iões de potássio vão estabelecer um equilíbrio com a superfície do elétrodo, sendo gerado um potencial proporcional ao algoritmo da atividade do analito na amostra. O potencial gerado na amostra é comparado ao potencial gerado numa solução padrão e a concentração dos iões é calculada pela equação de *Nernst*.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio e urina

Intervalo de medição: Soro/plasma 1 – 10 mmol/L (mEq/L)

Urina 2 – 300 mmol/L (mEq/L)

Valores de referência: Soro 3,5 – 5,1 mmol/L (mEq/L)

Plasma 3,4 – 4,5 mmol/L (mEq/L)

Urina 25 – 125 mmol/L/24h (mEq/L/24h)

Interferências: hemólise

Proteínas Totais

O ensaio para a determinação das proteínas totais baseia-se no método de *Weichselbaum*, utilizando o reagente de biureto. As ligações peptídicas de proteínas

interagem com os íons cúpricos do reagente de biureto, para formar um complexo roxo que é medido como uma reação de ponto final a 545 nm.

Amostra: Soro ou plasma em heparina de lítio

Intervalo de medição: 2,0 – 12,0 g/dL (20 – 120 g/L)

Valores de referência: 5,7 – 8,2 g/dL (57 – 82 g/L)

Proteínas Totais na urina/liquor

A determinação da concentração das proteínas totais na urina e no liquor utilizam um método diferente, uma vez que são líquidos biológicos com uma concentração muito inferior à verificada no sangue. Este método é uma análise química de ponto final, que se baseia na medição da variação de absorvância que ocorre quando o complexo de pirogaloil vermelho-molibdato se liga a grupos básicos aminoprotonados de proteínas a um pH ácido. O aumento de absorvância a 596 nm é proporcional à concentração de proteína na amostra.

Amostra: Urina ou líquido cefalorraquidiano (LCR)

Intervalo de medição: 1,0 – 125,0 mg/dL (10 – 1250 mg/L)

Valores de referência: Urina 24h 1 -14 mg/dL (10 – 40 mg/L)

LCR 8 – 32 mg/dL (80-320 mg/L)

Interferências: hemólise

Sódio

A determinação da concentração de sódio na amostra faz-se através do IMT. Assim, a amostra é posicionada no sensor e os íons de sódio vão estabelecer um equilíbrio com a superfície do eletrodo, sendo gerado um potencial proporcional ao algoritmo da atividade do analito na amostra. O potencial gerado na amostra é comparado ao potencial gerado numa solução padrão e a concentração dos íons é calculada pela equação de *Nernst*.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio e urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 50 – 200 mmol/L (mEq/L)

Urina 10 – 300 mmol/L (mEq/L)

Valores de referência: Soro e plasma 136 – 145 mmol/L (mEq/L)

Urina 40 – 220 mmol/L/24h (mEq/L/24h)

Triglicéridos

Para a determinação da concentração, os triglicérides são convertidos em glicerol e ácidos gordos livres, pela lipase, sendo o glicerol é convertido em glicerol-3-

fosfato por ação da glicerol quinase, seguindo-se a sua conversão em peróxido de hidrogénio pela glicerol-3-fosfato-oxidase. É então formado um composto colorido a partir do peróxido de hidrogénio, 4-aminofenazona e 4-clorofenol, através da peroxidase, cuja absorvância é medida, como uma reação de ponto final, a 505 nm.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou plasma em K3EDTA com potássio

Intervalo de medição: 10 – 550 mg/dL (0,11 – 6,22 mmol/L)

Valores de referência: < 150 mg/dL (< 1,70 mmol/L)

Interferências: bilirrubina

Troponina

A troponina é um complexo de três proteínas que em associação participam no processo de contração muscular do músculo esquelético e cardíaco, sendo o seu estudo essencial em caso de lesão cardíaca. A determinação da concentração da troponina é realizada através de quimioluminescência direta.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 0,045 ng/mL

Ureia

Para a determinação da sua concentração a ureia é hidrolisada na presença de água e urease para produzir amónia e dióxido de carbono, sendo que a amónia reage com o 2-oxoglutarato na presença de glutamato desidrogenase e NADH, levando à oxidação do NADH a NAD⁺. A redução da absorvância a 340 nm vai ser proporcional à concentração de ureia.

Amostra: Soro, plasma em heparina de lítio ou urina

Intervalo de medição: Soro e plasma 5 – 150 mg/dL (1,8 – 53,6 mmol/L)

Urina 35 – 1000 mg/dL (12,5 – 357,0 mmol/L)

Valores de referência: Soro e plasma 9 – 23 mg/dL (3,2 – 8,2 mmol/L)

Urina 12 – 20 g/24h (0,43 – 0,71 mol/24h)

Interferências: hemólise

Vitamina B12

A vitamina B12 é uma proteína necessária à eritropoiese, sendo a sua concentração determinada por quimioluminescência.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: 211 – 911 pg/mL

Interferências: hemólise

4.1.3. Proteínas Específicas

As proteínas específicas, são conhecidas como proteínas de fase aguda, cuja concentração plasmática aumenta (proteínas de fase aguda positiva), ou diminui (proteínas de fase aguda negativa) em resposta a um período de inflamação. Algumas destas proteínas contribuem para a sépsis, sendo importante a sua monitorização⁽⁷⁾.

α 1-antitripsina

A α 1-antitripsina é uma proteína de fase aguda positiva e a sua concentração pode ser determinada por turbidimetria.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 1 dia 145 – 270 mg/dL

 > 1 dia 78 – 200 mg/dL

Interferências: bilirrubina e lipémia

β 2-microglobulina

A β 2-microglobulina é uma proteína de fase aguda positiva cuja concentração é determinada através de um ensaio turbidimétrico.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: 1000 – 2400 ng/mL

Ceruloplasmina

A Ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda positiva e a sua concentração é determinada por turbidimetria.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: 20 – 60 mg/dL

Cistatina C

A Cistatina C é uma proteína associada à monitorização da função renal, cuja concentração é determinada por turbidimetria.

Amostra: Soro ou Plasma

Intervalo de medição: 0,27 – 9,4 mg/L

Valores de referência: 0,62 – 1,11 mg/L

Complemento C3

A proteína C3 do complemento é uma proteína de fase aguda positiva cuja concentração é determinada através de turbidimetria.

Amostra: Soro

Valores de referência: 90 – 180 mg/dL

Interferências: bilirrubina

Complemento C4

Bem como a proteína C3, a proteína C4 também é uma proteína do complemento de fase aguda positiva, cuja concentração é determinada através de turbidimetria.

Amostra: Soro

Valores de referência: 10 – 40 mg/dL

Interferências: bilirrubina

Ferritina

A ferritina é uma proteína de fase aguda positiva, que tem como principal função o armazenamento de ferro. A sua concentração é determinada por quimioluminescência.

Amostra: Soro ou plasma

<u>Valores de Referência</u> : Ferropenia absoluta	< 30 ng/mL
Ferropenia funcional	30 – 50 ng/mL
Ferropenia na gravidez	< 70 ng/mL
Ferropenia na insuficiência cardíaca	< 100 ng/mL ou 100 – 300 ng/mL, saturação < 20%
Ferropenia na IRC	< 500 ng/mL, saturação < 20%
Ferropenia na doença intestinal inflamatória	<100, saturação < 20%

Haptoglobina

A Haptoglobina é uma proteína de fase aguda positiva, que se liga à hemoglobina após a hemólise, permitindo a reciclagem deste componente dos eritrócitos. A concentração de haptoglobina é determinada através de turbidimetria.

Amostra: Soro

Valores de referência: 40 – 280 mg/dL

Interferências: hemólise e bilirrubina

Lipoproteína A

A determinação da lipoproteína A é feita através de turbidimetria, sendo que o doseamento desta lipoproteína se encontra associado ao estudo do colesterol LDL.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 30 mg/dL

Interferências: bilirrubina e lipémia

Procalcitonina

A procalcitonina é uma proteína de fase aguda positiva utilizada no diagnóstico da sépsis, cuja concentração é determinada por quimioluminescência.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 0,05 ng/mL

Se 0,05 – 0,5 ng/mL baixo risco de sépsis

Se 0,5 – 2 ng/mL moderado risco de sépsis

Se > 2ng/mL elevado risco de sépsis

Proteína C Reativa

A Proteína C Reativa é a principal proteína de fase aguda positiva, sendo um dos primeiros indicadores de um estado inflamatório ou infeccioso. A determinação da concentração de proteína C reativa é feita por turbidimetria.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: < 1 dia < 5 mg/L

1 dia – 1 semana < 3 mg/L

> 1 semana < 5 mg/L

Interferências: hemólise e lipémia

Transferrina

A Transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, que é responsável pelo transporte de ferro no sangue, sendo que alterações na concentração desta proteína estão associadas a doenças hematológicas e a processos inflamatórios. Esta concentração é determinada por turbidimetria.

Amostra: Soro ou plasma

Valores de referência: 215-380 mg/dL

Interferências: lipémia

4.2. Altino Max AX-4030® - Arkray

O Aution Max AX-4030® é um analisador automático que permite a realização da análise sumária da urina, utilizando o sistema de tiras de teste e tendo capacidade para 225 amostras por hora. Cada tira permite determinar a presença de diversos elementos na urina, tais como, glucose, eritrócitos, leucócitos, urobilinogénio, nitritos, bilirrubina, proteínas e cetonas. Este equipamento permite ainda a determinação do pH, da gravidade específica, da cor e da turbidez da amostra.



Figura 7 - Equipamento Aution Max AX-4030® que permite a análise sumária de urinas.

As urinas analisadas, tanto neste, como nos restantes analisadores de urinas mencionados adiante, não necessitam de nenhum tratamento prévio, exceto quando se apresentam viscosas, ou com elevada turbidez. Neste caso, devem ser centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos, previamente à sua inserção no equipamento para evitar danos neste.

4.3. Sedimax® – Menarini diagnostics

Em linha com o Aution Max AX-4030®, encontra-se o Sedimax®. Este aparelho automático permite a análise do sedimento urinário, sendo que parte da amostra é aspirada e centrifugada a 2000 rpm durante 10 segundos, permitindo a deposição do sedimento urinário no fundo da cuvette. Após a centrifugação, a câmara digital incorporada no microscópio vai fotografar 15 campos e um software de processamento de imagem vai detetar as partículas presentes nesses 15 campos. Este software permite a identificação de eritrócitos, leucócitos, cilindros hialinos, cilindros patológicos, células epiteliais, células epiteliais de transição, células tubulares renais, bactérias, leveduras, cristais de oxalato de cálcio, cristais de ácido úrico, muco e espermatozoides. Estas imagens podem posteriormente ser analisadas por um especialista, na validação de resultados, sendo que sempre que



Figura 4 - Equipamento Sedimax®, que se encontra em linha com o Aution Max AX-4030®, e que permite a análise automática do sedimento urinário.

suscitem dúvidas é realizada a observação do sedimento entre lâmina e lamela, ao microscópio ótico. Esta observação manual é também realizada aquando do pedido do estudo da morfologia eritrocitária, uma vez que o software de imagem mencionado não procede a este estudo.

4.4. Aution Max AX-4280® - Arkray

O Aution Max AX-4280® é um analisador automático em tudo idêntico ao Aution Max AX-4030®, que permite a realização da análise sumária da urina, utilizando o sistema de tiras de teste e tendo capacidade para 225 amostras por hora. A principal diferença é que não se encontra em linha com um analisador automático de sedimento urinário, pelo que é essencialmente utilizado para amostras que pedem exclusivamente a análise sumária da urina.



Figura 5 - Equipamento Aution Max AX-4280®, que permite a análise sumária de urinas.

4.5. Capillarys 2® - Sebia

O Capillarys 2® é um sistema automatizado multiparâmetros para eletroforese capilar, que realiza todos os procedimentos desde a identificação da amostra até à transmissão informática dos resultados obtidos.

Na eletroforese capilar as moléculas com carga elétrica são separadas através da mobilidade eletroforética, com fluxo constante. Neste equipamento temos 8 tubos de sílica que vão ser utilizados em simultâneo em cada amostra, sendo que a capacidade máxima é de 104 amostras, distribuídas por 13 raques.

No serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga são realizadas, neste equipamento, tanto eletroforeses de proteínas, como imunoeletroforeses.



Figura 6 - Equipamento Capillary 2® da casa comercial Sebia, que permite a realização de eletroforeses de proteínas, imunoeletroforeses e imunofenotipagem, por eletroforese capilar.

4.6. Técnicas Manuais

Cálculos Urinários

Os cálculos urinários são constituídos por substâncias orgânicas e inorgânicas insolúveis, como o oxalato e o fosfato de cálcio, a cistina, o ácido úrico, etc., sendo que as etiologias inerentes à formação dos mesmos são variáveis. O kit utilizado no Laboratório de Patologia do Hospital de Braga pertence à casa comercial BEN Biochemical Enterprise e permite a identificação (presença/ausência) de 8 componentes diferentes de cálculos urinários: o oxalato, o cálcio, o magnésio, o amónio, o carbonato, o fosfato, o ácido úrico e a cistina. Podem estar presentes vários destes componentes no mesmo cálculo urinário, pelo que a amostra usada para a realização destes testes deve ser homogénea e representativa. É ainda importante ressaltar que os cálculos urinários constituídos por colesterol não podem ser identificados por este kit.

Benzodiazepinas

As benzodiazepinas são drogas com efeitos ansiolítico, hipnótico, anticonvulsivo e relaxante muscular, que perduram por 4 a 8 horas. A maioria das benzodiazepinas têm uma via metabólica comum e são excretadas na urina sob a forma de oxazepam, que pode ser detetado até 7 dias após o consumo da droga. O teste para a deteção de benzodiazepinas é um teste rápido imunocromatográfico da *Xiamen Boson Biotech*, com base na reação antígeno anticorpo, realizado na urina.

Cutoff: 300 ng/mL

Sensibilidade: 100%

Especificidade: 98%

Interferências: Glucose > 2000 mg/dL

Albumina > 2000 mg/dL

Hemoglobina > 10 mg/dL

Ureia > 4000 mg/dL

Ácido úrico > 10 mg/dL

Opioides

Os opioides são drogas utilizadas no controlo da dor, sendo que o seu marcador metabólico é a morfina, que pode ser detetada após vários dias da sua ingestão. O teste para a deteção de opioides é um teste rápido imunocromatográfico da *Xiamen Boson Biotech*, com base na reação antígeno anticorpo, realizado na urina.

Cutoff: 300 ng/mL

Sensibilidade: 99%

Especificidade: 99%

Interferências: Glucose > 2000 mg/dL

Albumina > 2000 mg/dL

Hemoglobina > 10 mg/dL

Ureia > 4000 mg/dL

Ácido úrico > 10 mg/dL

Marijuana

Os agentes da marijuana são conhecidos como canabinoides e atuam como estimulantes do sistema nervoso central. A sua detecção faz-se através do 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH, que é o metabolito excretado na urina nos 3 a 10 dias após o consumo. O teste para a detecção de canabinoides é um teste rápido imunocromatográfico da *Xiamen Boson Biotech*, com base na reação antigénio anticorpo, realizado na urina.

Cutoff: 50 ng/mL

Sensibilidade: 99%

Especificidade: 100%

Interferências: Glucose > 2000 mg/dL

Albumina > 2000 mg/dL

Hemoglobina > 10 mg/dL

Ureia > 4000 mg/dL

Ácido úrico > 10 mg/dL

β hCG

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) é a hormona produzida aquando do desenvolvimento da placenta e aumenta após 7 a 10 dias da conceção, mantendo-se durante toda a gravidez, o que permite a detecção da gravidez de uma forma precoce. O teste para a detecção de β hCG é um teste rápido imunocromatográfico da *MONLAB*, com base na reação antigénio anticorpo, que pode ser realizado na urina, no soro ou no plasma.

Cutoff: 50 ng/mL

Sensibilidade: 100%

Especificidade: 100%

Interferências: Acetaminofeno > 20 mg/dL

Ácido acetilsalicílico > 20 mg/dL

Ácido ascórbico > 20 mg/dL

Ácido gentísico > 20 mg/dL

Dissertação – Mestrado em Análises Clínicas

Atropina > 20 mg/dL

Bilirrubina > 2 mg/dL (urina) e > 40 mg/dL (soro ou plasma)

Cafeína > 20 mg/dL

Glucose > 2000 mg/dL

Hemoglobina > 1 mg/dL

Triglicéridos > 1200 mg/dL

5. Valência de Imunologia

Responsável da área:

Dr. Fernando Mota Garcia (Médico, Assistente Graduado Sénior)

Orientadores do estágio nesta valência:

Dr. Fernando Mota Garcia

Dra. Juliana Almeida (Médica, Assistente Hospitalar)

Período de estágio:

11 de abril a 20 de maio de 2022

Atividades acompanhadas no período de estágio:

Manutenção e calibração de equipamentos

Execução e validação do controlo de qualidade interno (CQI)

Receção das amostras previamente triadas

Avaliação da conformidade de amostras

Processamento de amostras

Validação técnica de resultados

Validação clínica de resultados

Número de amostras analisadas no período de estágio:

2376

A imunologia é a área responsável pelo estudo da autoimunidade e da serologia infecciosa. Para além disso, por uma questão organizacional, é nesta área que se realizam as técnicas de citometria de fluxo, imunofenotipagem de linfócitos, pesquisa do antígeno HLA-B27, análise de espermograma e análise citológica de lavados broncoalveolares.

Na minha passagem por esta área pude acompanhar numerosas técnicas, algumas delas que já conhecia e outras com as quais tive um primeiro contacto. Gostaria de destacar a espectroscopia de fluorescência como a área que mais me fascinou, uma vez que requer maior conhecimento e experiência por parte do especialista que se dedica à interpretação dos seus resultados.

5.1. Zenit UP® + Zenit G-Sight®

O Zenit UP® é um equipamento que permite a automatização dos métodos de ELISA, microarray e imunofluorescência indireta (IFI) através de um sistema preciso e confiável de processamento de microplacas e lâminas. No contexto do laboratório de Imunologia do Hospital de Braga é utilizado apenas para a técnica de Imunofluorescência indireta, com processamento de lâminas⁽⁸⁾.



Figura 7 - Equipamento Zenit UP® que realiza ensaios por imunofluorescência(8).

As lâminas resultantes do método de imunofluorescência indireta podem ser interpretadas através da captação de imagens pelo sistema Zenit G-Sight®, que vai analisar e reconhecer padrões de fluorescência nestas lâminas, relacionados com a presença de determinados anticorpos, sendo estes posteriormente avaliados por um especialista, que poderá confirmar, ou alterar o resultado sugerido pelo software deste equipamento⁽⁹⁾.



Figura 8 - Equipamento Zenit G-Sight®, que permite a análise e reconhecimento de padrões em lâminas de imunofluorescência indireta(9).

5.1.1. Autoimunidade

Anticorpos antinucleares (ANA)

Os anticorpos antinucleares (ANA) constituem um marcador de numerosas patologias autoimunes, tratando-se de anticorpos anti-antígenos celulares. A sua deteção é feita por imunofluorescência indireta em células Hep-2, ou variantes desta linhagem celular.

Amostra: Soro

Substrato: Células Hep-2

Conjugado: IgG anti-humana de cabra marcado com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA)

Os anticorpos anti antígenos nucleares extraíveis (ENA) são detetados a partir de imunofluorescência indireta. Cada poço da lâmina, correspondente a um doente, tem um array de 9x9 com até 38 antígenos diferentes

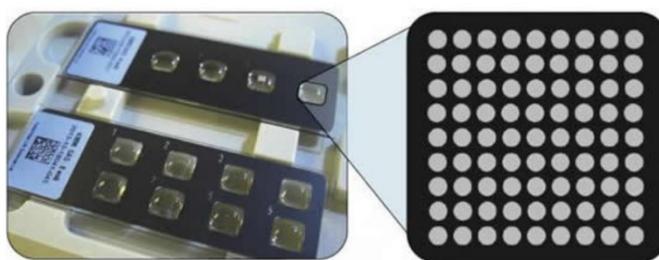


Figura 9 - Lâmina ZENIT-AmiDot® com 4, ou 8 poços que contém um painel específico de até 38 anticorpos diferentes quantificados em duplicado⁽¹⁰⁾.

quantificados em duplicado⁽¹⁰⁾. Os antígenos recorrentemente analisados no serviço de imunologia são Ro60, Ro52, La, Sm, RNP, PMscl 100, dsDNA, histonas, ribossomal P, Ku, PCNA, JO-1, Scl 70, Mi-2, PL7/12, elastase e CENP B.

Tabela 2 - Valores utilizados para a determinação da presença, ou ausência, de anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA), em U/ml ⁽¹¹⁾.

(U/ml)	Ro 60	Ro 52	La	Sm	RNP	PMscl 100	dsDNA	Histonas	Ribossomal P
Positivo	> 15	> 20	> 15	> 22	> 20	> 22	> 8	> 25	> 21
Equívoco	9-15	10-20	9-15	12-22	13-20	12-22	5-8	15-25	11-21
Negativo	< 9	< 10	< 9	< 12	< 13	< 12	< 5	< 15	< 11
	Ku	PCNA	JO-1	Scl70	Mi-2	PL7/12	Elastase	CENP B	
Positivo	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 18	> 20	> 20	
Equívoco	10-20	10-20	10-20	10-20	10-20	8-18	10-20	10-20	
Negativo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 8	< 10	< 10	

Amostra: Soro

Conjugado: IgG/IgA anti-humana de cabra

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-endomísio

O endomísio contém colagénio, reticulina e o antígeno alvo, a enzima transglutaminase tecidual. O padrão observado no substrato é descrito como padrão “favo de mel” ou “rede de galinheiro” a circundar as fibras musculares.

Amostra: Soro

Substrato: Secções da porção distal de esófago de primata

Conjugado: IgA anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-músculo liso

Os anticorpos anti-músculo liso são dirigidos a microfilamentos de F-actina, tropomiosina, troponina e tubulina e/ou filamentos intermediários de desmina e vimentina, do músculo liso.

Amostra: Soro

Substrato: Secções de fígado, rim e estômago de rato

Conjugado: IgG anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-LKM

O padrão *liver/kidney/microsomal* é observado na presença de autoanticorpos que têm como antígenos alvo enzimas do citocromo P450, sendo subclassificado em diferentes tipos de acordo com as enzimas alvo (LKM1, 2 e 3).

Amostra: Soro

Substrato: Secções de fígado, rim e estômago de rato

Conjugado: IgG anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-mitocôndria

Os anticorpos anti-mitocondriais são anticorpos dirigidos a proteínas da membrana mitocondrial interna e externa.

Amostra: Soro

Substrato: Secções de fígado, rim e estômago de rato

Conjugado: IgG anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-célula parietal gástrica

Os anticorpos anti-célula parietal estômago têm como alvo as subunidades α (92kDa) e β (60-90kDa) da ATPase H⁺/K⁺ gástrica, localizada na membrana intracelular e apical das células parietais.

Amostra: Soro

Substrato: Secções de fígado, rim e estômago de rato

Conjugado: IgG anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-músculo estriado

Os anticorpos anti-músculo estriado são autoanticorpos cujo alvo são as proteínas da junção neuromuscular. Os três epítomos mais reconhecidos pelos anticorpos anti músculo estriado são a tinina, o recetor de rianodina e Kv1.4 (uma subunidade α do canal de potássio VGKC), que apresentam valor de diagnóstico e prognóstico estabelecido.

Amostra: Soro

Substrato: Secções de músculo esquelético de primata

Conjugado: IgG anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-ilhéus de Langerhans

Os anticorpos anti-ilhéus pancreáticos reagem com diversos antigénios citoplasmáticos e membranares das células dos ilhéus de Langerhans.

Amostra: Soro

Substrato: Secções de pâncreas de primata

Conjugado: IgG anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

Anticorpos anti-suprarrenal

Os autoanticorpos anti suprarrenal apresentam reatividade dirigida às enzimas 17α -hidroxilase (P450c17) e 21β -hidroxilase (P450c21) e Cholesterol desmolase (P450scc), sendo que estas correspondem à zona glomerulosa e fasciculada.

Amostra: Soro

Substrato: Secções de glândula suprarrenal de primata

Conjugado: IgG anti-humana marcada com FITC

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas.

5.2. Microscópio de fluorescência

Nem todas as técnicas de imunofluorescência indireta são realizadas nos equipamentos automatizados, bem como nem todas as lâminas de imunofluorescência indireta são alvo de leitura por equipamentos automatizados. Algumas lâminas, preparadas quer manualmente, quer através de equipamentos automatizados são observadas ao microscópio de fluorescência, sendo a interpretação realizada pelo especialista responsável.



Figura 10 - Microscópio de fluorescência Motic BA410®, que permite a detecção de padrões de fluorescência(12).

O microscópio de fluorescência utilizado na área de Imunologia é do modelo Motic BA410e, que possui um sistema de filtros para FITC⁽¹²⁾.

Anticorpos anti *Rickettsia spotted fever* e anti *Rickettsia typhus* IgG e IgM

Os membros do género *Rickettsia* são tradicionalmente caracterizados em dois grupos principais o grupo *spotted fever* e *typhus*. A serologia por imunofluorescência indireta é o método *gold standard* para o diagnóstico de infeção por estes agentes.

Tipo de amostra: soro ou plasma

Substrato: antígeno de *Rickettsia rickettsii* e antígeno de *Rickettsia typhi* inativado

Conjugado: IgG anti-humana de cabra marcada com fluoresceína purificada por afinidade específica da cadeia de rato

IgM anti-humana de cabra marcada com fluoresceína purificada por afinidade específica da cadeia de rato

<u>Resultados:</u> IgM	$\geq 1:64$	presunção de infeção recente ou atual
	$< 1:64$	ausência de infeção
IgG	$\geq 1:256$	presunção de infeção recente ou atual
	1:256 – 1:64	infeção passada ou resposta precoce a uma infeção recente
	$< 1:64$	ausência de infeção

Interferências: Hemólise e lipémia

Espermograma

A avaliação laboratorial do sémen, em contexto hospitalar, é útil não só no estudo da infertilidade, mas também na confirmação da eficácia de vasectomias. Sendo que esta avaliação é realizada em três partes.

Na primeira parte, é feita a avaliação da cor, do volume, do pH e da viscosidade da amostra.

Na segunda parte, é montada uma câmara de *Neubauer* e preenchida com a amostra diluída, permitindo o estudo da motilidade dos espermatozoides, bem como a sua contagem. A classificação dos espermatozoides quanto à sua motilidade é realizada ao microscópio ótico e vai dividir-se em progressivos rápidos, progressivos, *in situ* e imóveis.

Por último, são realizados dois esfregaços corados, para a avaliação morfológica e classificação dos defeitos presentes como defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária e defeitos de cauda. Sendo ainda calculado o índice de teratozoospermia e realizada uma avaliação da morfologia celular.

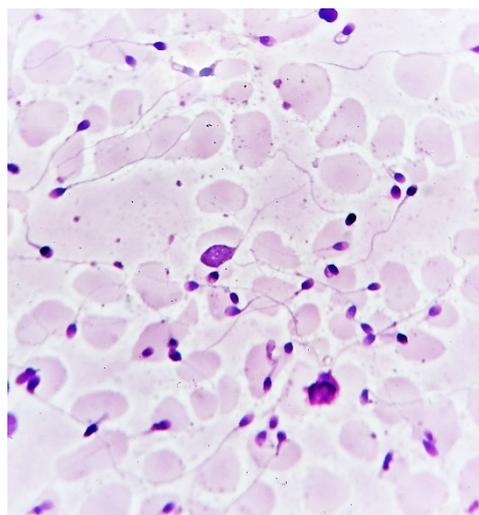


Figura 11 - Exemplo de esfregaço corado de sémen com presença de espermatozoides com defeitos de cabeça, peça intermédia e cauda.

5.3. Zenit RA®

O Zenit RA®, da Menarini, é um equipamento que permite a automatização da deteção de autoanticorpos por quimioluminescência. Esta técnica em particular é baseada num método indireto quimioluminescente de dois passos e utiliza partículas magnéticas revestidas com antigénio como fase sólida e um anticorpo marcado com o éster dimetil de acridina (DMAE) como marcador para a deteção (conjugado)⁽¹³⁾.



Figura 12 - Equipamento Zenit RA responsável pela deteção de autoanticorpos por quimioluminescência (13).

Anticorpos anti-dsDNA (double-stranded DNA)

A pesquisa de anticorpos anti-dsDNA é fundamental em patologias como o Lupus eritematoso sistêmico, com relevância para o seu diagnóstico, classificação e monitorização.

Amostra: Soro ou plasma em K3EDTA

Substrato: Partículas magnéticas revestidas com dsDNA

Conjugado: IgG anti-humana de rato marcada com um derivado de éster de acridina

Intervalo de medição: 0 – 600 UI/mL

Resultados:

Negativo	< 30 UI/mL
Zona cinzenta	30 – 50 UI/mL
Positivo	> 50 UI/mL

Interferências: Hemólise, lipémia, contaminação bacteriana, inativação por calor, presença de anticorpos heterófilos, efeito de *hook* em concentrações superiores a 1984 UI/mL.

Anticorpos anti- β 2-glicoproteína I

A β 2-glicoproteína I é uma proteína solúvel que desempenha diversas funções incluindo a regulação do complemento e hemostase. É o alvo antigénico de autoanticorpos presentes na síndrome anti fosfolipídica.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em heparina de lítio

Substrato: Partículas magnéticas revestidas com antigénio β 2-glicoproteína I

Conjugado: IgG/IgM anti-humana de rato marcada com um derivado de éster de acridina

Intervalo de medição: 0 – 867 UA/mL

Resultados:

Negativo	< 10 UA/mL
Positivo	> 10 UA/mL

Interferências: Hemólise, lipémia, efeito de *hook* em concentrações superiores a 699 UA/mL para anti- β 2-glicoproteína I IgM e a 1076 UA/mL para anti- β 2-glicoproteína I IgG.

Anticorpos antimembrana basal glomerular

O alvo dos anticorpos antimembrana basal glomerular é o colagénio tipo IV, que pode ser encontrado na membrana basal glomerular, no pulmão, olho, cóclea e também a nível cerebral e testicular.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em citrato de sódio

Substrato: Partículas magnéticas revestidas com antigénio NC1 α 3(IV)

Conjugado: IgG anti-humana de rato marcada com um derivado de éster de acridina

Intervalo de medição: 0 – 1000 UA/mL

Resultados: Negativo < 40 UA/mL
Positivo ≥ 40 UA/mL

Interferências: Hemólise, lipémia, efeito de *hook* em concentrações superiores a 1552 UA/mL.

Anticorpos anti-neutrófilo

Os anticorpos anti citoplasma dos neutrófilos (ANCA) têm como alvo a proteinase 3 (PR3) e mieloperoxidase (MPO).

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em heparina de lítio

Substrato: Partículas magnéticas revestidas com antigénio mieloperoxidase
Partículas magnéticas revestidas com antigénio proteinase 3

Conjugado: IgG anti-humana de rato marcada com um derivado de éster de acridina

Intervalo de medição: MPO 0 – 860 UA/mL

PR3 0 – 500 UA/mL

Resultados: Negativo < 10 UA/mL
Zona cinzenta 10 a 25 UA/mL
Positivo > 25 UA/mL

Interferências: Hemólise, lipémia, efeito de *hook* em concentrações superiores a 1843 UA/mL para o anti-MPO e concentrações superiores a 4501 UA/mL para o anti-PR3.

Anticorpos anti-transglutaminase

As transglutaminases são um grupo de enzimas amplamente distribuído que catalisam modificações pós translacionais nas proteínas. A transglutaminase tecidual, transglutaminase 2, é uma enzima ubíqua, que não se encontra restrita a nenhum compartimento celular específico e que exerce diversas funções fisiológicas, estando amplamente associada à doença celíaca.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em heparina de lítio

Substrato: Partículas magnéticas revestidas com antigénio t-TG

Partículas magnéticas sensibilizadas com anticorpos monoclonais de rato anti-IgA humana

Conjugado: IgA anti-humana de cabra e IgG anti-humana de rato marcadas com um derivado de éster de acridina

Intervalo de medição: 0 – 200 UA/mL

Resultados: Negativo < 10 UA/mL
Positivo ≥ 10 UA/mL

Interferências: Hemólise, lipémia, efeito de hook em concentrações superiores a 17400 UA/mL para anti- β 2-glicoproteína I IgA e a 2200 UA/mL para anti- β 2-glicoproteína I IgG.

Anticorpos anti-gliadina desaminada

Em complementaridade com os anticorpos anti-transglutaminase, a pesquisa de anticorpos anti-gliadina é útil perante a suspeita de doença celíaca, particularmente na população pediátrica.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em heparina de lítio

Substrato: Partículas magnéticas revestidas com antígeno gliadina (péptidos desaminados específicos)

Conjugado: Anticorpos anti-IgA humana de cabra e anti-IgG humana de rato marcadas com um derivado de éster de acridina

Intervalo de medição: 0 – 200 UA/mL

Resultados: Negativo < 10 UA/mL
Positivo > 10 UA/mL

Interferências: Hemólise, lipémia, efeito de hook em concentrações superiores a 1970 UA/mL para anti-gliadina IgA e a 5500 UA/mL para anti-gliadina IgG.

Anticorpos anti-cardiolipina

Os anticorpos anti-cardiolipina são um grupo heterogéneo de anticorpos podendo ser detetados em múltiplas situações clínicas como patologias autoimunes, cerebrovasculares e infecciosas.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em heparina de lítio

Substrato: Partículas magnéticas revestidas com cardiolipina de elevada pureza e β 2-glicoproteína I humana

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de ratinho marcada com um derivado de isoluminol e anti-IgM humana de ratinho marcada com um derivado de isoluminol

Intervalo de medição: IgG 0 – 280 U GPL/mL

IgM 2 – 255 U GPL/mL

Resultados: IgG Negativo < 20 U GPL/mL
Positivo baixo 20 – 39,9 U GPL/mL
Positivo moderado 40 – 79,9 U GPL/mL
Positivo alto \geq 80 U GPL/mL

IgM Negativo < 13 U GPL/mL
Zona cinzenta 13 – 14,9 U GPL/mL

Dissertação – Mestrado em Análises Clínicas

Positivo baixo 15 – 39,9 U GPL/mL

Positivo moderado 40 – 79,9 U GPL/mL

Positivo alto ≥ 80 U GPL/mL

Interferências: Hemólise, lipémia, icterícia, infecção por *Treponema pallidum* (possibilidade de reações cruzadas)

5.4. Dynex DSX Best 2000®

O Dynex DSX Best 2000® é um equipamento com um sistema de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) automatizado para a deteção de autoanticorpos, que conta com capacidade para 96 amostras distribuídas numa microplaca⁽¹⁴⁾.



Figura 13 - Equipamento Dinex Best 2000® para realização de ELISA para deteção de autoanticorpos(14).

5.4.1. Autoimunidade

Anticorpos anti-mitocondriais M2

Os anticorpos anti-mitocondriais do subtipo M2 são dirigidos a proteínas do componente E2 do complexo de enzimas da família 2-oxoácido desidrogenase. Neste ensaio detetam-se anticorpos dirigidos à subunidade E2 do complexo desidrogenase mitocondrial.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em heparina de lítio

Substrato: TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) com peróxido de hidrogénio

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com peroxidase

Intervalo de medição: 1 – 200 U/mL

Resultados: Negativo < 10 U/mL

Positivo > 10 U/mL

Interferências: Hemólise, lipémia e icterícia

Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)

Os anticorpos anti *Saccharomyces cerevisiae* têm como alvo antigénico o polissacarídeo manano da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e foram identificados como um marcador relevante da doença de Crohn.

Amostra: Soro, plasma em citrato de sódio

Substrato: TMB/H₂O₂

Conjugado: Anticorpos anti-IgA humana marcada com peroxidase

Anticorpos anti-IgG humana marcada com peroxidase

Intervalo de medição: 5 – 320 U/mL

Resultados: Negativo < 18 U/mL

Zona cinzenta 18 – 22 U/mL

Positivo > 22 U/mL

Interferências: Hemólise e lipémia acentuadas e contaminação por bactérias.

Anticorpos anti-fator intrínseco

Os anticorpos anti-fator intrínseco são um marcador muito específico para o diagnóstico de gastrite autoimune e síndromes de deficiência de B12 associados a esta patologia (anemia perniciosa, mielose funicular, etc.) e podem ser quantificados através de métodos de ELISA.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA, plasma em heparina ou plasma em citrato de sódio

Substrato: TMB/H₂O₂

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de coelho marcada com peroxidase

Intervalo de medição: 2 – 200 UR/mL

Resultados: Negativo < 20 UR/mL

Positivo ≥ 20 UR/mL

Interferências: Hemólise, icterícia ou lipémia acentuadas.

5.4.2. Serologia infecciosa

Borrelia spp.

O teste serológico para infecção por *Borrelia spp.* está indicado para diagnóstico em caso de suspeita de infecção pelo agente e realiza-se através de técnicas de ELISA, podendo ser posteriormente realizado um teste confirmatório por Western blot.

Amostra: Soro, plasma em citrato de sódio, LCR ou líquido sinovial

Substrato: TMB/H₂O₂

Conjugado: Anticorpos anti-IgM humana marcada com peroxidase

Anticorpos anti-IgG humana marcada com peroxidase

Intervalo de medição: 5 – 200 U/mL

Resultados: Calcular o índice de positividade $\left(\frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do cut off}} \right)$

Negativo	< 0,90
Zona cinzenta	0,90 – 1,10
Positivo	≥ 1,10

Interferências: Hemólise, icterícia ou lipémia acentuadas.

Pesquisa de anticorpos anti-Adenovírus

O diagnóstico de *Adenovírus* permite detetar imunoglobulinas das classes IgM e IgG e é realizado através de uma ELISA.

Amostra: Soro ou plasma em citrato de sódio

Substrato: TMB/H₂O₂

Conjugado: Anticorpos anti-IgG e anti-IgM humana marcada com peroxidase

Ponto de corte: 0,150 – 0,900

Resultados: A absorvância do controlo negativo deve ser menor do que metade da absorvância do ponto de corte e a absorvância do controlo positivo deve ser superior à do ponto de corte, permitindo a determinação do resultado da amostra

Negativo	< 0,9
Duvidoso	0,9 – 1,1
Positivo	≥ 1,1

Interferências: Hemólise ou lipémia

5.4.3. Outros testes

Estudo do complemento – CH50

O complemento é um conjunto de proteínas envolvidas na proteção do hospedeiro e, do qual são conhecidas três vias de ativação. A via clássica é iniciada pela formação de um complexo antigénio-anticorpo e pode ser avaliada pelo doseamento do CH50.

Amostra: Soro

Substrato: TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) com peróxido de hidrogénio

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com peroxidase de rábano

Intervalo de medição: 0 – 300 Eq/mL

Resultados: Valores de referência 79 – 187 Eq/mL

Interferências: Lipémia e amostras inativadas pelo calor ou contaminadas

Doseamento da cromogranina

As graninas são proteínas produzidas pelas células neuroendócrinas utilizadas frequentemente na avaliação de tumores neuroendócrinos, através do seu doseamento por ELISA.

Amostra: Soro ou plasma em K3EDTA

Substrato: TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine)

Conjugado: Anticorpos monoclonal anti-humano conjugado com HRP

Resultados: Negativo < 100 ng/mL

Positivo \geq 100 ng/mL

Interferências: Efeito de gancho com concentrações superiores a 100 000 ng/mL

Pesquisa de imunocomplexos circulantes (CIC-C1q)

Os imunocomplexos circulantes podem depositar-se nos tecidos e induzir processos inflamatórios. No caso dos imunocomplexos que se ligam ao C1q, estes encontram-se associados ao Lupus eritematoso sistémico e são úteis na avaliação da atividade da patologia, sendo doseados através de técnicas de ELISA.

Amostra: Soro ou plasma em K3EDTA

Substrato: TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) com peróxido de hidrogénio

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de coelho marcada com peroxidase

Limite de deteção: 0,1 UR/mL

Resultados: Negativo < 20 UR/mL

Positivo \geq 20 UR/mL

Interferências: Hemólise, lipémia e icterícia

5.5. Auto-LIA™ II®

O Auto-LIA™ II®, da Fujirebio, é um equipamento que permite a realização de Western blots e imunoensaios de forma totalmente automatizada, da hibridação até ao desenvolvimento da cor, e é utilizado para a deteção de anticorpos⁽¹⁵⁾.



Figura 14 - Equipamento Auto-LIA™ II® da Fujirebio, que permite a realização de ensaios imunoenzimáticos⁽¹⁵⁾.

5.5.1. Autoimunidade

Anticorpos anti-neuronais

A detecção destes anticorpos, realizada através de Western blot, está associada à síndrome paraneoplásica neurológica.

Amostra: Soro, plasma em EDTA, plasma em heparina ou plasma em citrato de sódio

Substrato: cloreto de tetrazóico nitro azul (5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato)

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com fosfatase alcalina

Resultados: Avaliar cada amostra classificando semi-quantitativamente para cada antigénio em +/- se banda com cor débil e 1+,2++ ou 3+++ de acordo com a intensidade da cor da banda (mediana, forte, muito forte).

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas

Anticorpos anti-proteínas do ouvido interno (68 KDa)

A determinação de anticorpos anti HSP 70 (a que corresponde o antigénio 68 KDa) pode ser útil para prever a resposta à corticoterapia num conjunto de doentes com patologia autoimune do ouvido interno, caracterizada por perda de audição rapidamente progressiva e pode ser realizada por Western blot.

Amostra: Soro

Substrato: Heat shock protein 70 (HSP70) recombinante purificada

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana

Resultados: Avaliar cada amostra classificando semi-quantitativamente para cada antigénio em +/- se banda com cor débil e 1+, 2++ ou 3+++ de acordo com a intensidade da cor da banda (mediana, forte, muito forte).

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas e concentração de fator reumatoide > 100 EU/mL

5.5.2. Serologia Infeciosa

Pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia spp.*

O teste serológico para infeção por *Borrelia spp.* está indicado em caso de suspeita de infeção pelo agente e realiza-se através de técnicas de ELISA, como vimos anteriormente, podendo ser posteriormente realizado um teste confirmatório por Westernblot.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA, plasma em heparina, plasma em citrato ou LCR

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de coelho marcada com peroxidase

Anticorpos anti-IgM humana de coelho marcada com peroxidase

Resultados: verificar a existência da linha de controlo (1ª), da linha da classe do anticorpo (IgM ou IgG) e o controlo de ponto de corte. Atribuir pontuação a cada uma das linhas visíveis, de acordo com a tabela.

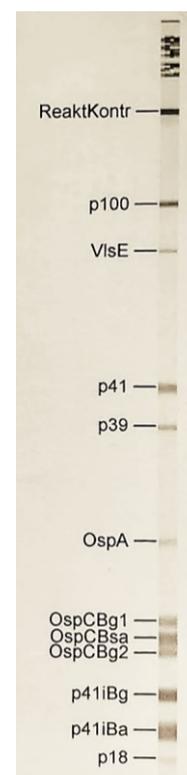


Figura 95 - Exemplo de tira de teste, para deteção de anticorpos anti-*Borrelia spp.*, com legenda das bandas correspondentes.

Tabela 3 - Pontos atribuídos a cada linha visível na tira de teste, para deteção de anticorpos anti-*Borrelia spp.*

Antigénio	p100	VlsE	p58	p41	p39	OspA	OspC	p18
IgG	5	6	4	1	5	5	5	5
IgM	5	5	4	1	4	5	8	5

	IgM	IgG
Negativo	≤ 5 pontos	≤ 5 pontos
Zona cinzenta	6 pontos	6 – 7 pontos
Positivo	≥ 7 pontos	≥ 8 pontos

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, amostras inativadas pelo calor, reação cruzada com *Treponema spp.*, CMV e amostras positivas para anticorpos antinucleares.

Pesquisa de anticorpos anti-VIH1 e anti-VIH2

A pesquisa de anticorpos anti-VIH é realizada através de um immunoblot e os anticorpos são dirigidos a proteínas e glicoproteínas específicas para VIH1 e VIH2, nomeadamente sgp120, gp41, p31, p24, p17, sgp105 e gp36, o que permite o diagnóstico diferencial.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA, plasma em heparina ou plasma em citrato de sódio

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com fosfatase alcalina

Resultados: Para que o teste seja válido, deve avaliar-se a banda de controlo de cada tira de teste, bem como as bandas +/-, 1+ e 3+, que vão servir de comparação para a leituras das bandas dos antígenos de cada amostra, para a avaliação semiquantitativa.

VIH-1: específicas sgp120 e gp41

VIH-2: específicas sgp105 e gp36

Interferências: Presença de anticorpos anti-estreptavidina

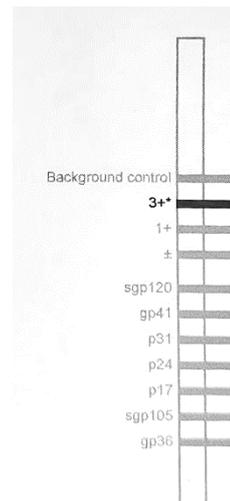


Figura 16 - Exemplo de tira de teste, para deteção de antígenos do VIH, com legenda das bandas correspondentes.

Pesquisa de anticorpos anti-VHC

O vírus da hepatite C (VHC) tem proteínas estruturais e não estruturais, que podem ser detetadas por immunoblot: região hipervariável E2, região da helicase NS3, NS4A, NS4B e NS5A.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA, plasma em heparina ou plasma em citrato de sódio

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com fosfatase alcalina

Resultados: Para que o teste seja válido, deve avaliar-se a banda de controlo de cada tira de teste, bem como as bandas +/-, 1+ e 3+, que vão servir de comparação para a leituras das bandas dos antígenos de cada amostra, para a avaliação semiquantitativa. Para ser considerada positiva a amostra tem de apresentar pelo menos duas linhas +/-.

Interferências: Presença de anticorpos anti-estreptavidina

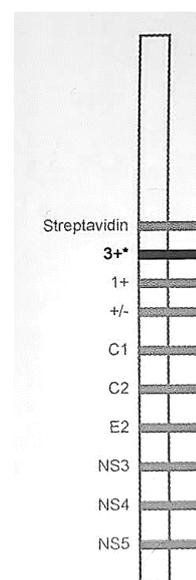


Figura 104 - Exemplo de tira de teste para deteção de VHC, com legenda das bandas correspondentes.

Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*

A leishmaniose é uma zoonose doméstica que envolve cães, mas que também afeta os humanos. O diagnóstico serológico, através de um immunoblot constitui uma alternativa de fácil implementação e utilização na rotina laboratorial.

Amostra: Soro ou LCR

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com fosfatase alcalina.

Resultados: Uma amostra positiva pode apresentar numerosas bandas entre 8 e 200 kDa, sendo que a presença de uma banda nos 14 kDa ou 16 kDa é indicativa da presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania*

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas (interpretar com precaução)

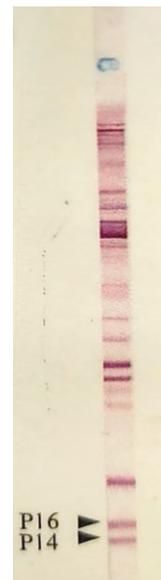


Figura 113 - Exemplo de tira de teste para a detecção de Leishmania por Western blot positiva.

Pesquisa de anticorpos anti-*Taenia solium*

A infecção pelo estágio larval de *Taenia solium* é responsável pelo desenvolvimento de cisticercose, sendo que o diagnóstico é feito com o auxílio de testes serológicos (Westernblot) e exames de imagem.

Amostra: Soro ou LCR

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com fosfatase alcalina.

Resultados: Uma amostra positiva pode apresentar numerosas bandas entre 2 e 200 kDa, sendo por questões de especificidade apenas as bandas entre 6 e 55 kDa são selecionadas. As bandas presentes com maior frequência são 6-8, 12, 23-26, 39, 50-55 kDa. A banda P6-8 pode surgir como uma banda nos 6 kDa única e espessa, ou como uma dupla banda. A banda P50-55 surge como uma banda ampla com contornos irregulares. As bandas 6-26 kDa e 39-55 kDa são as mais específicas e de mais fácil leitura e interpretação. A presença de pelo menos duas bandas bem definidas entre as cinco previamente descritas é indicativo de cisticercose ou neurocisticercose (LCR)

Interferências: reações cruzadas com helmintos e *Plasmodium falciparum*, hemólise, lipémia e icterícia

Pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara canis*

A pesquisa de anticorpos para este agente é relevante para estabelecer um diagnóstico e é realizada por Westernblot.

Amostra: Soro ou LCR

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de cabra marcada com fosfatase alcalina, NaN_3 e estabilizadores.

Resultados: Uma amostra positiva pode apresentar bandas entre 15 e 200 kDa. Pesquisar bandas de 24-35 kDa de baixo peso molecular é mais específica, uma vez que a presença de bandas de alto peso molecular 70-90 kDa e 100-200 kDa pode ser resultante de uma reação cruzada com outros helmintos. A presença simultânea de duas bandas entre 24 e 35 kDa é indicativa da presença de anticorpos específicos para *Toxocara canis*.

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas

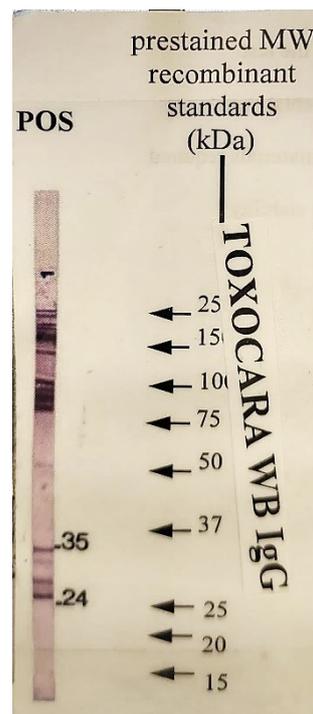


Figura 19 - Exemplo de tira de teste para a detecção de *Toxocara canis* por Westernblot positiva.

5.6. LIAISON® e LIAISON XL®

A gama LIAISON® da DiaSorin, que no Laboratório de Patologia do Hospital de Braga conta com dois equipamentos, um LIAISON® e um LIAISON XL®. Estes pertencem a uma gama de analisadores por quimioluminescência automatizados, que utilizam uma tecnologia com micropartículas paramagnéticas em fase sólida⁽¹⁶⁾.



Figura 130 - Equipamento LIAISON® da DiaSorin para a realização de ensaios por quimioluminescência (16).



Figura 21 - Equipamento LIAISON XL® da DiaSorin para a realização de ensaios por quimioluminescência (16).

5.6.1. Serologia Infeciosa

Pesquisa de anticorpos anti-cápside EBV

O vírus *Epstein-Barr* ou herpesvirus humano 4 manifesta-se nos adultos como um síndrome mononucleósica, sendo que os testes serológicos, que utilizam a quimiluminescência, são frequentemente utilizados para distinguir os estados de infecção por este agente, bem como no diagnóstico diferencial de outros agentes patogênicos responsáveis por síndromes mononucleósicas.

Amostra: Soro, plasma em citrato, plasma em K3EDTA e plasma em heparina

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgM e anti-IgG humana de ratinho marcada com um derivado do isoluminol

Intervalo de medição: IgM 10 - 160 U/mL

IgG 10 – 750 U/mL

Resultados: IgM < 20 U/mL Negativo

IgM 20 – 40 U/mL Duvidoso

IgM ≥ 50 U/mL Positivo

IgG < 20 U/mL Negativo ou fase precoce de uma infecção primária

IgG ≥ 20 U/mL Positivo

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, amostras que contêm partículas sólidas, contaminação bacteriana e reações cruzadas com anticorpos IgM contra o vírus da rubéola, CMV ou parvovírus B19.

Pesquisa de anticorpos anti-early EBV

Amostra: Soro, plasma em citrato, plasma em K3EDTA e plasma em heparina

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de ratinho marcada com um derivado do isoluminol

Intervalo de medição: 5 - 150 U/mL

Resultados: < 10 U/mL Negativo

10 – 40 U/mL Duvidoso

≥ 40 U/mL Positivo

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, amostras que contêm partículas sólidas e contaminação bacteriana

Pesquisa de anticorpos anti EBNA (*Epstein-Barr* nuclear antigen)

Amostra: Soro, plasma em citrato, plasma em K3EDTA e plasma em heparina

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de ratinho marcada com um derivado do isoluminol

Intervalo de medição: 3 - 600 U/mL

Resultados: < 5 U/mL Negativo

5 – 20 U/mL Duvidoso

≥ 20 U/mL Positivo

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, amostras que contêm partículas sólidas e contaminação bacteriana

Pesquisa de anticorpos anti-HSV1

O *Vírus herpes simplex 1* (HSV-1) é o agente etiológico de múltiplas infecções e os testes serológicos auxiliam na identificação de infecção, quer passada, quer recente.

Amostra: Soro

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de rato marcada com um derivado do isoluminol

Resultados: < 0,9 Negativo

0,9 – 1,1 Duvidoso

≥ 1,1 Positivo

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, amostras que contêm partículas sólidas e contaminação bacteriana

Pesquisa de anticorpos anti-HSV2

O *Vírus Herpes simplex 2* (HSV-2) é o principal agente etiológico de úlcera genital, sendo também responsável pelo herpes neonatal. Os testes serológicos, nomeadamente a determinação de IgG por quimiluminescência, podem auxiliar na identificação da infecção.

Amostra: Soro, plasma em citrato, plasma em K3EDTA e plasma em heparina

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de ratinho marcada com um derivado do isoluminol

Resultados: < 0,9 Negativo

0,9 – 1,1	Duvidoso
≥ 1,1	Positivo

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, amostras que contêm partículas sólidas e contaminação bacteriana

Pesquisa de anticorpos anti-HSV1/2 IgM

A pesquisa de anticorpos da classe IgM permite diferenciar uma infecção recente, de uma infecção passada.

Amostra: Soro

Substrato: TMB

Conjugado: Anticorpos anti-IgM humana de ratinho marcada com um derivado do isoluminol e anticorpos anti-IgG humana de ratinho policlonal não específica

Resultados:

< 0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Duvidoso
≥ 1,1	Positivo

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, amostras que contêm partículas sólidas e contaminação bacteriana

Pesquisa de anticorpos anti-Parvovírus B19

O Parvovírus B19 é um vírus com tropismo para as células precursoras eritrocitárias, sendo que a serologia é fundamental no diagnóstico da infecção por este agente. Neste caso o diagnóstico serológico é feito através de um ensaio quimioluminescente.

Amostra: Soro

Substrato: TMB

Conjugado: Antígeno recombinante VP2 do parvovírus B19 conjugado com um derivado do isoluminol

Intervalo de medição: IgM 0,1 – 48
IgG 0,1 – 46

Resultados:

IgM	< 0,9	Negativo
IgM	0,9 – 1,1	Duvidoso
IgM	≥ 1,1	Positivo
IgG	< 0,9	Negativo
IgG	0,9 – 1,1	Duvidoso
IgG	≥ 1,1	Positivo

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas, fator reumatoide, mononucleose infecciosa, amostras que contêm partículas sólidas e contaminação bacteriana

5.6.2. Outros testes

Doseamento da 25-hidroxi-vitamina D

A vitamina D atua como precursor hormonal e tem ação na absorção do cálcio, no metabolismo ósseo, na regulação do desenvolvimento celular e na atividade imunológica. Assim, o seu doseamento é útil para o diagnóstico de insuficiência, bem como para a monitorização da terapêutica, sendo feito através de um ensaio quimioluminescente.

Amostra: Soro, plasma em K3EDTA ou plasma em heparina de lítio

Substrato: TMB

Conjugado: 25-OH vitamina D conjugada com um derivado do isoluminol

Intervalo de medição: 4 – 150 ng/mL

Resultados:

Deficiência	< 10 ng/mL
Insuficiência	10 – 30 ng/mL
Suficiência	30 – 100 ng/mL
Toxicidade	> 100 ng/mL

Interferências: Hemólise, icterícia e lipémia acentuadas

5.7. Cytomics FC500®

O Cytomics FC500®, da Beckman Coulter, é um citómetro de fluxo que permite a introdução quer de um carrocel de amostras, quer de uma placa, para análise, e tem capacidade para realizar análises de 5 cores com um laser duplo de 488nm e 635 nm⁽¹⁷⁾. Este aparelho encontra-se situado na área de Imunologia e é utilizado para imunofenotipagem de linfócitos no diagnóstico e monitorização de doentes com VIH, bem como na monitorização de doentes de neurologia.



Figura 22 - Equipamento Cytomics FC500®, da Beckman Coulter, utilizado para realização de citometria de fluxo⁽¹⁷⁾.

Exame citológico do Lavado Bronco-Alveolar (LBA)

O processamento de um LBA auxilia no diagnóstico de doenças pulmonares e inclui a contagem celular total e diferencial, bem como a imunofenotipagem dos linfócitos. A contagem celular total é realizada no equipamento Sysmex XN-2000® e a execução do citoesfregaço na citocentrífuga Cytospin 3 SHANDON®, sendo que ambos os equipamentos se encontram localizados na área da Hematologia. A contagem diferencial é posteriormente realizada ao microscópio ótico e a imunofenotipagem dos linfócitos é realizada por citometria de fluxo.

Amostra: LBA

Marcadores monoclonais: CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 e CD16

Imunofenotipagem de linfócitos T, B e NK

A imunofenotipagem de linfócitos é relevante no seguimento de doentes com imunodeficiência secundária ao VIH, no diagnóstico de imunodeficiências primárias e na monitorização de doentes sob terapêuticas (ex: rituximab).

Amostra: Sangue total em K3EDTA

Marcadores monoclonais: CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 e CD16

5.8. Quantum Blue®

O Quantum Blue® de segunda geração, da Buhlmann, vai analisar a intensidade das bandas controlo e teste de uma imunocromatografia, transformando a intensidade, num valor quantitativo, correspondente à concentração na amostra. Neste caso, é utilizado na monitorização da terapêutica com Adalimumab e o Infliximab⁽¹⁸⁾.



Figura 23 - Equipamento Quantum Blue® da Buhlmann que permite a quantificação de bandas em cassetes de imunocromatografia(18).

O Adalimumab e o Infliximab são utilizados em múltiplas patologias, sendo que os doentes deixam de responder a estes fármacos ao longo do tempo. Assim, o doseamento destes fármacos, bem como a pesquisa de anticorpos contra estes são fundamentais para o ajuste da terapêutica.

Doseamento de Adalimumab

Amostra: soro

Intervalo de medição: 1,3 – 35 µg/mL

Intervalo terapêutico: 5 – 12 µg/mL

Resultados: Deve considerar-se que a cassete é válida quando a linha de controlo é visível. Uma linha na zona de teste indica presença de Adalimumab e deve ser quantificada no aparelho, no entanto, a ausência de linha aparente também deve ser confirmada pelo aparelho.

Interferências: Reação cruzada com certolizumabe, efeito de gancho em concentrações superiores a 369 µg/mL, hemólise, lipémia, icterícia, fator reumatoide superior a 497,3 IU/mL e TNF α superior a 2,6 ng/mL.

Doseamento de Anti-Adalimumab

Amostra: soro

Resultados: Deve considerar-se que a cassete é válida quando a linha de controlo é visível. Uma linha na zona de teste indica presença de Adalimumab e deve ser quantificada no aparelho, no entanto, a ausência de linha aparente também deve ser confirmada pelo aparelho.

Negativo se a concentração < 1,3 µg/mL

Positivo se a concentração \geq 1,3 µg/mL

Interferências: Reação cruzada com Infliximab, efeito de gancho em concentrações superiores a 150 µg/mL, hemólise, lipémia, icterícia, fator reumatoide superior a 796 IU/mL.

Doseamento de Infliximab

Amostra: soro

Intervalo de medição: 0,4 – 20 µg/mL

Intervalo terapêutico: 3 – 7 µg/mL

Resultados: Deve considerar-se que a cassete é válida quando a linha de controlo é visível. Uma linha na zona de teste indica presença de Adalimumab e deve ser quantificada no aparelho, no entanto, a ausência de linha aparente também deve ser confirmada pelo aparelho.

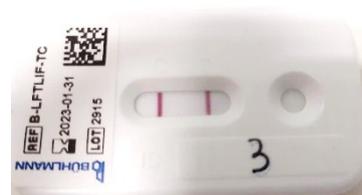


Figura 24 - Exemplo de cassete de imunocromatografia com amostra positiva para o doseamento do Infliximab.

Interferências: Reação cruzada com certolizumab, efeito de gancho em concentrações superiores a 369 µg/mL, hemólise, lipémia, icterícia, fator reumatoide superior a 497,3 IU/mL e TNFα superior a 2,6 ng/mL.

Doseamento de Anti-Infliximab

Amostra: soro

Resultados: Deve considerar-se que a cassette é válida quando a linha de controlo é visível. Uma linha na zona de teste indica presença de Adalimumab e deve ser quantificada no aparelho, no entanto, a ausência de linha aparente também deve ser confirmada pelo aparelho.

Negativo se a concentração < 1,3 µg/mL

Positivo se a concentração ≥ 1,3 µg/mL

Interferências: Reação cruzada com certolizumab, efeito de gancho em concentrações superiores a 150 µg/mL, hemólise, lipémia, icterícia e fator reumatoide superior a 796 IU/mL.

5.9. Técnicas manuais

5.9.1. Aglutinação e Hemaglutinação

***Rickettsia spp.* - reação de Weil-Felix**

A reação de Weil-Felix baseia-se no princípio de que alguns antígenos de certos serotipos da bactéria *Proteus spp.* apresentam reação cruzada com espécies de *Rickettsia spp.* sofrendo aglutinação.

Amostra: soro

Substrato: suspensão das bactérias *Proteus OX2*, *Proteus OX19* e *Proteus OXK*

Resultados: formação de aglutinação corresponde a uma amostra positiva, sendo que o controlo positivo tem de apresentar um resultado positivo e o controlo negativo tem de apresentar um resultado negativo. O título corresponderá à diluição do último círculo onde se observar aglutinação

Interferências: hemólise e lipémia

***Brucella* spp. – Reação de Wright**

A brucelose é uma infecção zoonótica causada por bactérias de *Brucella* spp.. Os testes de aglutinação específicos para *Brucella* spp. envolvem a aglutinação de antígenos bacterianos por anticorpos específicos.

Amostra: soro

Substrato: suspensão das bactérias

Brucella abortus e *Brucella melitensis*

Resultados: formação de aglutinados corresponde a uma amostra positiva, sendo que o controlo positivo tem de apresentar um resultado positivo e o controlo negativo tem de apresentar um resultado negativo. O título corresponderá à diluição do último círculo onde se observarem os aglutinados

Interferências: hemólise e lipémia

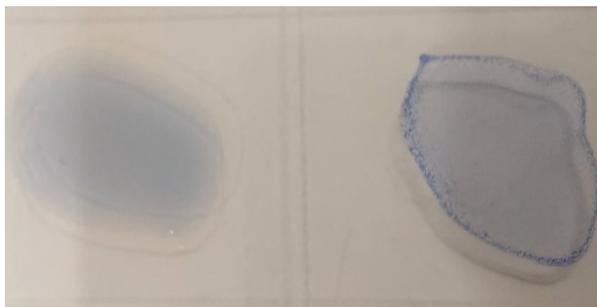


Figura 25 - Exemplo de cartão com reação de Wright negativa (à esquerda) e positiva (à direita).

***Salmonella typhi* – Reação de Widal**

A reação de Widal é uma técnica serológica auxiliar no diagnóstico de febre tifoide. Este teste baseia-se na demonstração da presença de aglutininas no soro do doente reativas aos antígenos H (flagelares A, B e C) e O (somáticos A, B e C) de *Salmonella typhi*.

Amostra: soro

Resultados: formação de aglutinados corresponde a uma amostra positiva, sendo que o controlo positivo tem de apresentar um resultado positivo e o controlo negativo tem de apresentar um resultado negativo. O título corresponderá à diluição do último círculo onde se observarem os aglutinados

Interferências: hemólise e lipémia

***Treponema pallidum* – rapid plasma reagin (RPR)**

O diagnóstico de sífilis, no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga, inicia-se com um teste de rastreio treponémico CLIA. No caso deste teste ser negativo, o resultado é libertado, já no caso de ser positivo é efetuado este teste complementar não treponémico, o RPR.

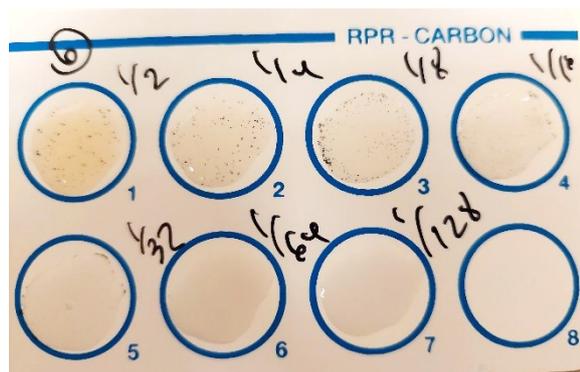


Figura 26 - Cartão de aglutinação com partículas de carvão RPR com amostra positiva ao título 1/64.

Se este teste for positivo confirma-se o diagnóstico. Se, por outro lado, for negativo terá de se realizar um terceiro teste (TPHA).

Amostra: soro, plasma ou LCR

Resultados: formação de aglutinação corresponde a uma amostra positiva, sendo que em caso de teste reativo deverão realizar-se diluições seriadas para determinação do título de reatividade

Interferências: hemólise, icterícia, lipémia, fator reumatoide e efeito prozona com títulos superiores a 1/128.

***Treponema pallidum* – *Treponema pallidum* hemagglutination assay (TPHA)**

Através de um método indireto de hemaglutinação, poderemos confirmar a presença, ou ausência de *Treponema pallidum*, sempre que as técnicas mencionadas anteriormente são contraditórias. Para isso a amostra é misturada com o reagente, podendo gerar agregados de células.

Amostra: soro, plasma ou LCR

Tabela 4 - Resultados possíveis para o teste do *Treponema pallidum*

Resultados:

Fortemente positivo (4+)	Massa de células uniforme a cobrir todo o poço
Positivo (3+)	Massa de células a cobrir parcialmente a base do poço
Positivo (2+)	Massa uniforme de células rodeada de anel de células
Fracamente positivo (1+)	Massa pequena de células rodeada por um anel mais pequeno e distinto de células
Indeterminado (+/-)	Anel de células bem definido com um centro claro
Negativo	Botão compacto na base do poço

Interferências: hemólise

5.9.2. Imunocromatografia

Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira*

A pesquisa de anticorpos, IgG e IgM, anti-*Leptospira interrogans* é realizada por imunocromatografia e é útil no diagnóstico de infecção por este agente.

Amostra: soro, plasma em heparina, plasma em K3EDTA ou plasma em citrato de sódio

Conjugado: Anticorpos anti-IgG humana de rato

Anticorpos anti-IgM humana de rato

Resultados: Confirmar reação na linha controlo que contém anticorpos anti-rato de cabra e quando positiva observar as linhas para IgM e IgG (linhas ténues devem ser consideradas positivas)

IgM positivo → possível infecção recente

IgM e IgG positivo → possível infecção antiga

IgG positivo → possível infecção antiga

Interferências: hemólise, icterícia, lipémia e fator reumatoide

Pesquisa de anticorpos anti-*Mycoplasma pneumoniae*

O *Mycoplasma pneumoniae* é um agente comum de pneumonia adquirida na comunidade. A pesquisa de anticorpos IgM específicos para *Mycoplasma pneumoniae* é útil para o diagnóstico de infecção por este agente e faz-se através de imunocromatografia.

Amostra: soro

Conjugado: Anticorpos anti-IgM humana marcado com fosfatase alcalina com tampão 0,1% de azida de sódio

Resultados: Confirmar reação na linha controlo que contém anticorpos anti-IgM humano e quando positiva observar a linha de teste

IgM positivo → possível infecção recente

Interferências: hemólise, icterícia, lipémia e fator reumatoide



Figura 27 - Cartão de teste por imunocromatografia para o diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*

6. Valência de Hematologia

Responsável da área:

Dra. Marina Majar (Médica, Assistente Hospitalar)

Orientador do estágio nesta valência:

Dra. Beatriz Araújo (Médica, Assistente Hospitalar)

Período de estágio:

23 de maio a 1 de julho de 2022

Atividades acompanhadas no período de estágio:

Receção das amostras previamente triadas

Processamento e avaliação da conformidade de amostras

Execução e validação do controlo de qualidade interno (CQI)

Execução e apreciação dos resultados obtidos na avaliação externa da qualidade (AEQ)

Manutenção e calibração de equipamentos

Gestão de stocks

Validação técnica de resultados

Validação clínica de resultados

Número de amostras analisadas no período de estágio:

47 500

A Hematologia é conhecida, de forma generalizada, como a área que se ocupa do estudo dos constituintes do sangue. Sendo que esse estudo inclui o hemograma, o estudo das variantes de hemoglobina, o estudo da coagulação, a avaliação de alterações em esfregaços de sangue periférico, a análise citológica de líquidos biológicos e a pesquisa de parasitas no sangue.

Neste estágio tive a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos em Hematologia acompanhando as atividades desenvolvidas pelos profissionais da área, mas também realizei outras atividades que beneficiaram o serviço. Organizei e categorizei as lâminas de sangue periférico armazenadas no serviço para estudo, numa laminoteca, organizada em patologia do glóbulo rubro e patologia benigna e maligna da série leucocitária. Elaborei um guia prático do diagnóstico parasitológico no sangue, com informações sobre os parasitas mais comuns no sangue. Tive a oportunidade de realizar

uma apresentação de um artigo científico – *Integrating Artificial Intelligence into Haematology Training and Practice* – com foco na implementação de algoritmos de inteligência artificial, não só na área de Hematologia, mas integrando as diferentes áreas de conhecimento da Patologia Clínica.

6.1. Sysmex CS-2500®

O serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga conta com dois Sysmex CS-2500®, que são analisadores da coagulação automatizados da casa comercial SIEMENS Healthineers. Estes equipamentos contam com a tecnologia que permite avaliar a presença de interferências HIL, bem como a presença de coágulos e são utilizados tanto na rotina laboratorial, como para ensaios mais específicos⁽¹⁹⁾.



Figura 28 - Equipamento Sysmex CS-2500 da casa comercial SIEMENS Healthineers, analisador do estudo da coagulação(19).

Tempo de protrombina (PT)

O tempo de protrombina é o tempo necessário à coagulação e permite avaliar indiretamente a atividade dos fatores II, V, VII e X. No caso do kit da Siemens, utiliza dois reagentes, o Tromborel S e o Dade Innovin.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Valores de referência: < 12 segundos

Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)

O tempo de tromboplastina parcial ativada é o tempo necessário para a coagulação a partir da ativação do fator XII, permitindo avaliar indiretamente a atividade dos fatores VIII, IX, XI e XII. No equipamento CS-2000, para além do kit que permite a determinação do APTT de uma forma inicial, existe um kit (Dade Actin FS Activated PTT) que permite a determinação deste tempo quando este se encontra alongado, permitindo ter tempos mais precisos.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Valores de referência: < 28 segundos

Tempo de trombina

O tempo de trombina é o tempo de coagulação na presença de trombina em excesso, que contribui para o estudo de patologias associadas ao fibrinogénio, fibrina e heparina.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Valores de referência: 14 – 21 segundos

Fibrinogénio

A concentração de fibrinogénio é determinada através do método de *Clauss*, que consiste num ensaio que mede o tempo de conversão do fibrinogénio em fibrina, na presença de excesso de trombina, sendo que esse tempo é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Intervalo de medição: 0,80 – 12,00 g/L

Valores de referência: 2 – 4 g/L

D-dímeros

O INNOVANCE D-dímeros é um ensaio imunoturbidimétrico que permite a quantificação dos D-dímeros (produtos de degradação da fibrina), permitindo a exclusão de trombose venosa profunda e embolia pulmonar, como elevado valor preditivo negativo.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Intervalo de medição: 0,17 – 4,40 mg/L

Valores de referência: $\leq 0,50$ mg/L

Antitrombina III

O INNOVANCE Antithrombin é um ensaio cromogénico baseado no fator Xa, que mede a atividade da antitrombina III. A combinação com a quantificação do antígeno da antitrombina permite distinguir deficiências qualitativas de deficiências quantitativas deste inibidor.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

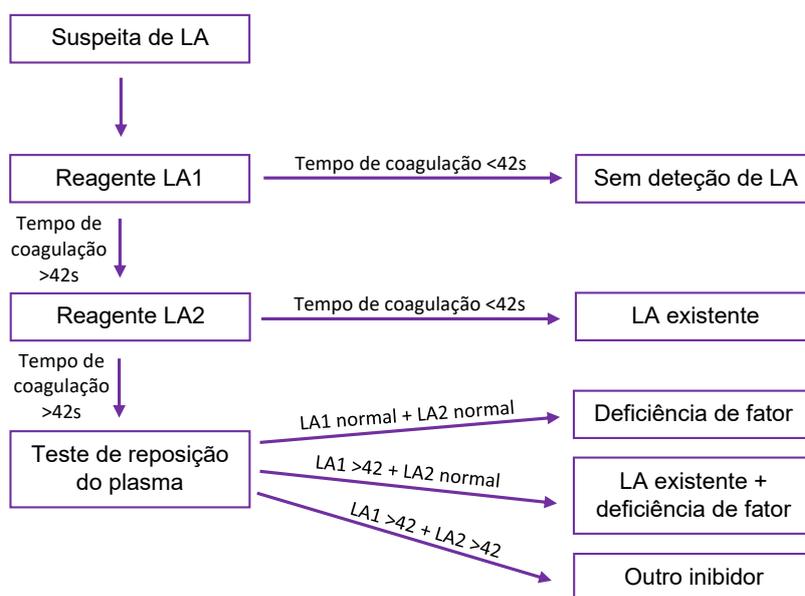
Intervalo de medição: 0 – 140 %

Valores de referência: 80 – 120%

Anticoagulante lúpico

O anticoagulante lúpico (LA) é uma classe de imunoglobulinas que se ligam a complexos formados por fosfolípidos carregados negativamente e a proteínas, resultando no prolongamento dos tempos de coagulação. Para detetar a presença de anticoagulante lúpico utiliza-se o kit da Siemens que contém um algoritmo com dois reagentes: LA1, para screening, e LA2, como teste confirmatório.

Amostra: sangue total em citrato de sódio



Esquema 1 - Esquematização do algoritmo de utilização dos reagentes do anticoagulante lúpico, para determinação da causa de alongamento dos tempos de coagulação

Proteína C

A determinação da proteína C faz-se através de um ensaio coagulométrico, que determina a atividade da proteína C.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Valores de referência: 70 – 140 %

Proteína S livre

A proteína S livre, associada a doenças tromboembólicas, é detetada e quantificada através do kit INNOVANCE free Protein S Ag, da Siemens, baseado na ligação da proteína S a anticorpos monoclonais.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Intervalo de medição: 10 – 150%

Valores de referência: Homem 70 – 140 %

Mulher 60 – 130 %

Anticoagulantes

O ensaio INNOVANCE Anti-Xa é um ensaio cromogénico utilizado para a determinação quantitativa da atividade da heparina não fracionada e de baixo peso molecular, bem como de anticoagulantes orais (rivaroxabano e apixabano).

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Intervalo de medição para anticoagulantes orais: 20 – 350 ng/mL

Intervalo de medição para heparina: 0,10 – 1,50 UI/mL

Valor de referência para heparina: 0 – 1 UI/mL

Fator de Von Willebrand

No estudo do fator de von Willebrand são utilizados dois ensaios. O ensaio INNOVANCE VWF Ac é um ensaio para a determinação da atividade do fator de Von Willebrand através de turbidimetria. Já o ensaio VWF Ag é um ensaio por imunoturbidimetria, que determina a presença do antigénio, complementando o ensaio anterior e permitindo a distinção entre deficiências quantitativas e qualitativas do fator.

Amostra: sangue total em citrato de sódio

Intervalo de medição: 4 – 600 %

Valores de referência: 50 – 200 %

6.2. Sysmex XN-2000®

O Sysmex XN-2000® é uma combinação de dois analisadores numa mesma plataforma analítica com capacidade de processar até 200 amostras por hora. Este equipamento para além da análise do sangue total em K3EDTA (hemograma), estuda líquidos biológicos, como é o caso dos líquidos cefalorraquidiano, sinovial, pericárdico, peritoneal e pleural^(20, 21).



Figura 29 - Equipamento Sysmex XN-2000 da casa comercial Sysmex, que realiza a análise da fração eritrocitária, leucocitária e plaquetária.

6.2.1. Leucócitos (WBC)

A análise dos leucócitos é realizada por citometria de fluxo fluorescente com corante de polimetina específico para ácidos nucleicos e lise celular específica, sendo a realização do diferencial leucocitário expressa num gráfico que mostra as diferentes populações celulares, sendo que a luz dispersa

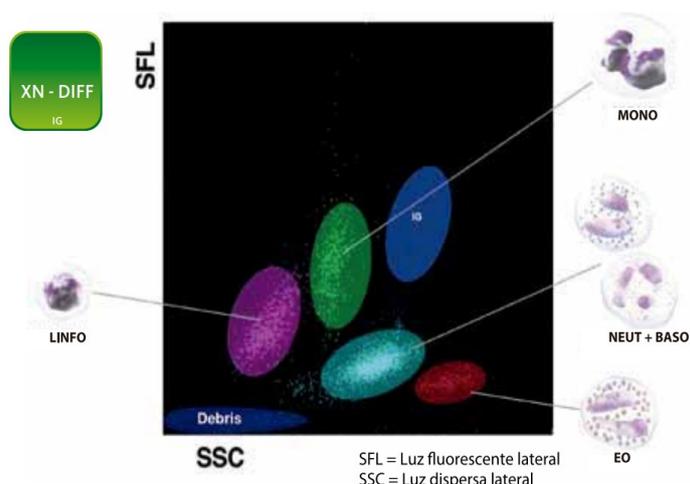


Figura 30 - Gráfico exemplificativo do diferencial leucocitário realizado pelo Sysmex XN-2000, com áreas para as diferentes populações celulares.

lateralmente corresponde à complexidade da morfologia da célula e a fluorescência frontal corresponde ao tamanho. Assim, é possível separar neutrófilos (NEUT), linfócitos (LYMPH), monócitos (MONO), eosinófilos (EO), basófilos (BASO) e granulócitos imaturos (IG) no sangue periférico, bem como detetar células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) em líquidos biológicos. Com base na metodologia SAFLAS – *Sysmex Adaptive Flagging Algorithm based on Shape-recognition* – que analisa o número de células, a forma, as dimensões e a área de cada população no gráfico, são gerados alarmes para a análise mais detalhada por parte do especialista⁽²¹⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA ou líquidos biológicos

Intervalo de medição: 0 – 440 x 10³ /μL (sangue total)

0 – 10000 x10³ /μL (líquidos biológicos)

Valores de referência: 4,5 – 11,0 x10³ /μL

Tabela 5 - Valores de referência das populações leucocitárias nas amostras analisadas no Sysmex XN-2000

Populações	NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO	IG	MN	PMN
Amostra	Sangue total em K3EDTA						Líquidos Biológicos	
Valores de referência (%)	54 – 62	25 – 33	3 – 7	1 – 3	0 – 0,75	0 – 0,6	–	–

6.2.2. Eritrócitos (RBC)

Como parte do hemograma, os eritrócitos, são quantificados por impedância e foco hidrodinâmico, sendo estudados muitos outros parâmetros com eles relacionados, como é o caso da concentração de hemoglobina, o hematócrito, etc..

Amostra: sangue total em K3EDTA ou líquidos biológicos

Intervalo de medição: 0 – $8,60 \times 10^6$ / μ L (sangue total)

0 – 5000×10^6 / μ L (líquidos biológicos)

Valores de referência: Homem 4,3 – $5,9 \times 10^6$ / μ L

Mulher 3,5 – $5,5 \times 10^6$ / μ L

Hemoglobina (HGB)

A determinação da concentração de hemoglobina faz-se através do método de sulfato Lauril de sódio, livre de cianeto.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: Homem 13,5 – 17,5 g/dL

Mulher 12,0 – 16,0 g/dL

Hematócrito (HCT)

O hematócrito é um parâmetro que indica a percentagem de eritrócitos no volume total de sangue através de impedância e foco hidrodinâmico.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: Homem 41 – 53 %

Mulher 36 – 46 %

Volume corpuscular médio (MCV)

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 80 – 100 fL

Hemoglobina corpuscular média (MCH)

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 25 – 35 pg

Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC)

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 31 – 36 g/dL

Eritrócitos nucleados (NRBC)

Os NRBCs apresentam uma dimensão e um núcleo semelhante aos linfócitos, podendo ser classificados erradamente pelos analisadores hematológicos. O Sysmex XN-2000 através de citometria de fluxo fluorescente contabiliza os NRBCs e corrige a fórmula leucocitária, bem como a contagem total de leucócitos, apresentando os NRBCs em percentagem (por 100 leucócitos) e em concentração absoluta (por μL)⁽²²⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Índice de distribuição dos eritrócitos (RDW)

O RDW é um índice que fornece informação sobre a variação do tamanho dos eritrócitos em percentagem, sendo um parâmetro fundamental para avaliar a anisocitose de uma população eritrocitária.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 11,5 – 14,0 %

Reticulócitos (RET)

As células rubras anucleadas circulantes no sangue periférico são classificadas e diferenciadas pelo seu tamanho e estado de maturação. O Sysmex XN-2000 utiliza a citometria de fluxo fluorescente para diferenciar os reticulócitos em reticulócitos de baixa, média e alta fluorescência⁽²¹⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 0,5 – 1,5%

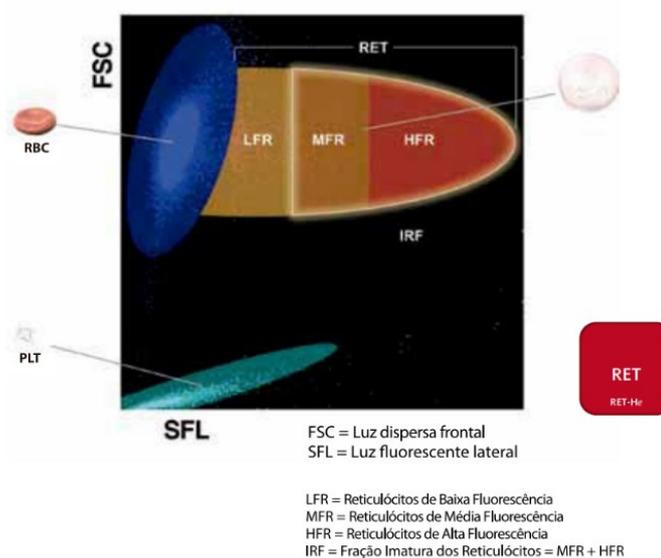


Figura 31 - Gráfico de dispersão dos reticulócitos com base na luz dispersa frontalmente em função da luz fluorescente lateral e que permite a distinção dos eritrócitos imaturos⁽²¹⁾.

Fração dos reticulócitos imaturos (IRF)

Os reticulócitos de média e alta fluorescência são considerados reticulócitos imaturos, sendo que a fração de reticulócitos imaturos é um indicador relacionado com a eritropoiese, fundamental na resposta medular⁽²³⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 1,6 – 10,5 %

Conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos (RET-He)

Representado como RET-He nos equipamentos da Sysmex corresponde ao equivalente de hemoglobina do RBCs e é medido através de citometria de fluorescência, com o corante polimetina. Este parâmetro é um importante preditor precoce da anemia ferropénica, bem como um marcador precoce após o tratamento com ferro⁽²³⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 28 – 35 pg

6.2.3. Plaquetas (PLT)

Neste equipamento, a contagem das plaquetas é realizada por impedância e foco hidrodinâmico. Quando a precisão desta contagem não pode ser garantida por este método, as plaquetas são marcadas com um fluoróforo, sendo realizada nova contagem das plaquetas num novo canal que utiliza citometria de fluxo fluorescente, com o corante Oxazina. Este segundo método minimiza as interferências da presença de micrócitos e fragmentos, tanto de eritrócitos, como de leucócitos, bem como de agregação plaquetária e marcada anisocitose⁽²¹⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Intervalo de medição: 0 – 5000 x 10³ /µL

Valores de referência: 150 – 400 x 10⁹ /L

Volume plaquetário médio (MPV)

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 7,00 – 10,00 fL

Fração das plaquetas imaturas (IPF)

O Sysmex XN-2000 é capaz de analisar graus de imaturidade das plaquetas da mesma forma que analisa reticulócitos, ou seja, as plaquetas com elevada fluorescência são consideradas plaquetas imaturas, sendo apresentada a percentagem de plaquetas imaturas face às plaquetas totais⁽²¹⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valores de referência: 1,1 – 7,1 %

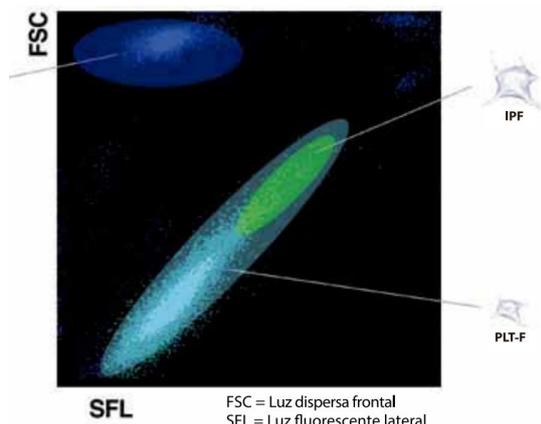


Figura 32 - Gráfico de distribuição da luz dispersa frontalmente pelas plaquetas, em função da luz fluorescente lateral.

6.3. Ves matic 30[®]

O Ves matic 30[®], da DIESSE, é um equipamento automatizado que permite a determinação da velocidade de sedimentação em até 30 amostras simultaneamente, em 26 minutos⁽²⁴⁾.



Figura 33 - Equipamento Ves matic 30 da DIESSE para determinação da velocidade de sedimentação.

6.3.1. Velocidade de Sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação do sangue é a velocidade com que os eritrócitos sedimentam no fundo de uma suspensão de plasma sanguíneo, sendo analisado o coeficiente de sedimentação, equivalente ao método *gold standart – Westergren*. Estes resultados estão aumentados em associação a processos inflamatórios, como é o caso das doenças autoimunes.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valor de referência: Homem 0 – 15 mm/1^ahora

Mulher 0 – 20 mm/1^ahora

6.4. Adams A1c HA-8180T®

O Adams A1c HA-8180T® é um analisador automático da ARKRAY para o estudo da hemoglobina glicada (HbA1c), através de HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho). No entanto, para além da hemoglobina glicada, este equipamento determina a hemoglobina A2 e a hemoglobina fetal (HbF), podendo ainda detetar as principais variantes de hemoglobina (S, C, E ou D), quando presentes⁽²⁵⁾.



Figura 34 - Equipamento Adams A1c HA-8180T da ARKRAY utilizado no estudo da hemoglobina glicada e outras variantes de hemoglobina.

6.4.1. Hemoglobina glicada

A Hemoglobina glicada (HbA1c) é um parâmetro que permite avaliar a concentração média de glicose no sangue nos últimos 3 meses, sendo utilizado rotineiramente no diagnóstico e controlo da diabetes⁽²⁶⁾.

Amostra: sangue total em K3EDTA

Valor de referência: Normal < 5,7 %

Pré-Diabetes 5,7 – 6,4 %

Diabetes ≥ 6,5 %

6.4.2. Variantes da hemoglobina (HPLC)

Apesar do equipamento disponível estar mais direccionado para o estudo da hemoglobina glicada, este tem capacidade de identificar e quantificar as principais variantes de hemoglobina (HbA1, HbF, HbA2, S, C, E e D), podendo ainda alertar para a presença de outros picos anormais sem proceder à sua identificação.

6.5. Citocentrífuga Shandoai Cytospin 3®

A Citocentrífuga Shandoai Cytospin 3®, da ThermoScientific, é uma centrífuga de baixa velocidade utilizada para a realização de citoesfregaços de líquidos biológicos e com capacidade para 12 amostras em simultâneo. Os citoesfregaços consistem na deposição de uma monocamada de células, mantendo a integridade das mesmas e permitindo a sua contagem ao microscópio ótico⁽²⁷⁾.



Figura 35 - Citocentrífuga Shandoar Cytospin 3 da ThermoScientific para a realização de citoesfregaços.

6.6. Outras técnicas

6.6.1. Análise do esfregaço de sangue periférico

O esfregaço de sangue periférico permite avaliar e caracterizar todos os elementos figurados do sangue (leucócitos, glóbulos rubros e plaquetas) ao microscópio, tendo um papel bastante relevante no diagnóstico hemato-oncológico. Este é realizado sempre que há um alerta (*Flag*) do equipamento XN-2000®, uma alteração numa linhagem, valores fora dos valores de referência, ou suspeita de alguma alteração, por parte do patologista clínico. Também são feitas colaborações com os clínicos, com observações de esfregaços com pedidos pertinentes por parte deles.

Para a análise da série branca e das plaquetas utiliza-se uma técnica de coloração manual rápida – coloração Hemacolor (adaptação do método *May-Grunwald-Giemsa*). A coloração rápida inicia-se com um 1º corante, o metanol que funciona como um fixador, preservando as células e aumentando a resistência do esfregaço. De seguida, utiliza-se um corante ácido, a eosina, que irá corar de rosa/vermelho os componentes básicos das células. Por fim, utiliza-se o azul de metileno (corante básico) para os componentes ácidos das células de azul arroxeadado.

Para análise da série rubra é utilizada outra coloração manual, a coloração de *Leishman*. O corante de *Leishman* é um derivado do corante de *Ramanowsky* e é constituído por uma mistura de eosinato de azul de metileno, eosinato de violeta e azul de metileno. Esta coloração apresenta melhores resultados do que a anterior para a análise da série rubra, bem como para a pesquisa de parasitas, mantendo resultados

semelhantes na série branca. Apesar dos resultados serem globalmente melhores, é uma técnica que requer mais tempo não sendo prática a sua aplicação a todos os esfregaços de sangue periférico.

O laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga, tem no horizonte a implementação de um sistema automatizado de preparação e coloração de amostras, que permita uma coloração mais uniforme, rápida e com melhores resultados.

Para além da análise das células sanguíneas, o esfregaço de sangue periférico, bem como a técnica da gota espessa são utilizados para a pesquisa de parasitas no sangue, como é o caso do *Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.*, etc.. No caso do laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga, o parasita mais procurado é o *Plasmodium spp.*, responsável pela malária, existindo um kit no serviço para a deteção de antigénio deste parasita que complementa a pesquisa ao microscópio.

6.6.2. Pesquisa de eosinófilos

A pesquisa de eosinófilos pode ser realizada tanto na urina, associada a problemas renais, como em secreções nasais, características da asma brônquica. O pedido mais comum é o realizado na urina, sendo para isso realizado um citoesfregaço e a coloração da lâmina, com a coloração Hemacolor. Este citoesfregaço vai ser observado ao microscópio ótico, sendo realizada a pesquisa e contagem diferencial de eosinófilos.

6.6.3. Antigénio do *Plasmodium spp.*

A pesquisa do antigénio do *Plasmodium spp.* faz-se através do teste imunocromatográfico BinaxNOW Malária, da Abbott. Este teste identifica o antigénio da proteína II rica em histidina, específica do *Plasmodium falciparum* e/ou um antigénio malárico comum a quatro das espécies capazes de causar doença em humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*). Apesar do kit apresentar um bom desempenho é realizada a pesquisa dos parasitas no esfregaço de sangue periférico, tal como recomendado pela OMS, com o intuito de identificar a espécie (quando possível) e determinar a parasitémia, uma vez que a sensibilidade do kit diminui bastante quando temos uma parasitémia mais baixa.

Amostra: sangue total venoso ou capilar em K3EDTA

Especificidade: 94,2%

Sensibilidade: 94,3%

6.6.4. *Criptococcus neoformans*

Pode ser realizada a pesquisa de *Criptococcus neoformans* através do teste rápido *CrAg*[®] *Lateral Flow Assay*. Este teste utiliza a técnica de imunocromatografia para a deteção qualitativa de antigénios polissacarídeos, da cápsula do *Cryptococcus spp.*, podendo ser também utilizado o tradicional teste da tinta-da-china em exame a fresco.

Amostra: LCR

6.6.5. *Crioglobulinas*

Na pesquisa de crioglobulinas é usado o sangue total colhido em tubo de EDTA e em tubo com gel separador, ambos pré-aquecidos a 37°C, sendo transportados de imediato para o laboratório e mantidos a 37°C. Após a formação do coágulo no tubo com gel, as amostras são centrifugadas e o soro e o plasma são conservados a 4°C. Após 7 dias, as amostras são observadas para verificar a formação de precipitado. Se houver formação de precipitado, é novamente aquecida a 37°C para confirmar se há dissolução do precipitado. Havendo dissolução do precipitado confirma-se a presença de crioglobulinas.

Amostra: Sangue total em K3EDTA e tubo com gel separador

6.6.6. *Fragilidade osmótica*

O teste de fragilidade osmótica eritrocitária é um método que permite avaliar a resistência membranar dos eritrócitos quando submetidos a várias concentrações osmóticas de cloreto de sódio. Assim, 50 µL da amostra são adicionados a soluções salinas com diferentes concentrações, sendo que esta mistura vai ser observada ao microscópio para avaliação da integridade da membrana celular dos eritrócitos.

Amostra: Sangue total em K3EDTA

6.6.7. *Pesquisa de cristais*

A presença de cristais nos líquidos articulares é uma preocupação clínica uma vez que se encontra associada a quadros clínicos dolorosos. Por isso, estes líquidos são enviados para o laboratório para ser realizada a pesquisa de cristais em microscópio de luz polarizada.

7. Valência de Biologia Molecular

Responsável da área:

Dr. Fernando Branca (Técnico Superior)

Orientador do estágio nesta valência:

Dr. Fernando Branca

Período de estágio:

8 de agosto a 26 de agosto de 2022

Atividades acompanhadas no período de estágio:

Processamento de amostras

Avaliação da conformidade de amostras

Execução e validação do controlo de qualidade interno (CQI)

Manutenção e calibração de equipamentos

Gestão de stocks

Validação técnica de resultados

Validação clínica de resultados

Número de amostras analisadas no período de estágio:

7 276

A Biologia Molecular é a área do laboratório que incide essencialmente sobre o estudo dos ácidos nucleicos, sendo uma área que complementa todas as outras áreas do laboratório. Apesar de muitas vezes ser mais facilmente associada ao estudo das doenças genéticas, a Biologia Molecular tem também uma forte importância no diagnóstico microbiológico, hematológico e imunológico, tendo tido, mais recentemente, um papel muito importante no diagnóstico da COVID-19. Nesta área são realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR, RT-PCR, etc.) e eletroforeses (capilar, em gel de agarose, etc.), bem como a extração e purificação dos ácidos nucleicos para execução destas técnicas.

Sendo uma área altamente específica e que requer material com custos elevados, apesar de me terem sido apresentados todos os equipamentos, as técnicas que realizei e em que me tornei autónoma foram limitadas. Assim, vou apresentar brevemente os

principais equipamentos e irei fazer uma descrição mais extensa das técnicas que tive oportunidade de realizar no decorrer do meu estágio.

7.1. KingFisher Flex®

O Sistema KingFisher Flex®, da ThermoFisher Scientific, é utilizado para a extração e purificação de ácidos nucleicos de forma automatizada, tendo capacidade para até 96 amostras em cada corrida. Este procedimento de extração é realizado em 7 passos, que correspondem a 7 placas específicas colocadas no equipamento. Em primeiro lugar são adicionadas partículas magnéticas (1ª placa) e anticorpos específicos para o ácido nucleico que pretendemos extrair (2ª placa), sendo realizada uma primeira lavagem para remover os anticorpos que não se ligaram às partículas magnéticas de forma específica (3º placa). De seguida, é adicionada a amostra (4ª placa), que se vai ligar aos anticorpos específicos, e são realizadas duas lavagens (5ª e 6ª placas) para remover todo o conteúdo que não se ligou às partículas magnéticas. Por fim, é adicionado um tampão de eluição (7ª placa) que vai promover a libertação dos ácidos nucleicos dos anticorpos⁽²⁸⁾.



Figura 36 - Equipamento KingFisher Flex®, da ThermoFisher Scientific, para extração e purificação dos ácidos nucleicos.

Aos ácidos nucleicos resultantes da extração vão ser aplicadas outras técnicas, como por exemplo a reação de polimerase em cadeia (PCR), realizadas noutros equipamentos.

7.2. Magna Pure 24®

O Sistema Magna Pure 24® da Roche é, à semelhança do equipamento anterior, é um equipamento automático de extração de ácidos nucleicos, com capacidade para 24 amostras por corrida. No serviço de Patologia do Hospital de Braga existem dois equipamentos destes, que são utilizados com maior frequência que o anterior, uma vez que



Figura 248 - Equipamento Magna Pure 24®, da Roche, para extração e purificação de ácidos nucleicos.

permitem a extração a partir de vários tipos de amostra (sangue total, plasma, soro, exsudados nasais, lavados broncoalveolares, urinas e fezes) e de vários tipos de tubo, eliminando a necessidade de preparação prévia. No entanto, o volume mínimo de amostra necessário para realizar a extração neste equipamento (200µL) é superior ao do equipamento anterior (20µL) pelo que há extrações que têm de ser realizadas no KingFisher Flex⁽²⁹⁾.

Neste equipamento a extração realiza-se de forma semelhante à do equipamento anterior, mas é dividida em apenas cinco passos. Primeiro a amostra é lisada e as nucleases inativadas. De seguida, adicionam-se as partículas magnéticas à amostra e o complexo formado entre as partículas magnéticas e os ácidos nucleicos é separado da restante amostra. Por fim, são realizadas múltiplas lavagens e é realizada a eluição dos ácidos nucleicos, que se separam das partículas magnéticas.

7.3. LightCycler 480 II®

Após a extração e purificação dos ácidos nucleicos das amostras, pelos equipamentos Magna Pure 24® e KingFisher Flex®, estes vão ser analisados por outros equipamentos, nomeadamente pelo LightCycler 480 II®. Este é um equipamento que realiza PCR em tempo real, em placas de 96 poços, e permite a deteção de uma porção específica dos ácidos nucleicos, a quantificação dos mesmos e a pesquisa de mutações e polimorfismos de um único nucleótido (SNPs)⁽³⁰⁾.



Figura 38 - Equipamento LightCycler 480 II®, da Roche, para realização de PCR em tempo real.

7.4. QuantStudio™ 5®

O QuantStudio™ 5® é um sistema que realiza PCR em tempo real em placas com capacidade para 96 amostras, pertencente à casa comercial ThermoFisher Scientific, que funciona de forma semelhante ao equipamento anterior⁽³¹⁾.



Figura 39 - Equipamento QuantStudio™ 5®, da ThermoFisher Scientific, para realização de PCR em tempo real.

7.5. Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler®

O Equipamento Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler® é um equipamento para a realização de ciclos de amplificação da reação de polimerização em cadeia, que é utilizado em cooperação com o equipamento SeqStudio™ Genetic, podendo configurar-se diferentes ciclos de amplificação, com tempos e temperaturas diferentes⁽³²⁾.



Figura 40 - Equipamento Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler®, da ThermoFisher Scientific, para realização de PCR.

7.6. SeqStudio™ Genetic®

O SeqStudio™ Genetic® é um analisador que analisa os ácidos nucleicos amplificados pelo Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler através de eletroforese capilar baseada em fluorescência, permitindo, por exemplo, identificar a presença de agentes patogênicos nas amostras⁽³³⁾.



Figura 41 - Equipamento SeqStudio Genetic®, da ThermoFisher Scientific, para realização de eletroforese capilar.

No Laboratório de Patologia do Hospital de Braga esta combinação de equipamentos é utilizada para a deteção do SARS-CoV-2.

7.7. Cobas 480 System®

O sistema Cobas 4800® é constituído por dois equipamentos, o Cobas p 480® e o Cobas z 480®.

O Cobas p 480® é um equipamento que se destina a realizar o processamento pré-analítico das amostras, realizando



Figura 42 - Sistema Cobas® 4800, da Roche, constituído por dois equipamentos Cobas p 480® (à esquerda) e Cobas z 480® (à direita).

processos simples como pipetagem, homogeneização, distribuição por alíquotas, etc., mas também alguns processos mais complexos como aquecimento e adição de

reagentes. Assim, os passos intermédios entre os equipamentos de extração e os de reação de polimerização em cadeia, que nos restantes equipamentos são realizados por técnicos, são realizados por este equipamento, sendo apenas necessária a introdução das amostras, após a extração dos ácidos nucleicos, e posteriormente a mudança de equipamento para o Cobas z 480[®]. O Cobas z 480[®] é um analisador que realiza PCR em tempo real, em placas de 96 poços, e funciona de forma muito semelhante ao Cobas 480 II[®], sendo que o software funciona em articulação entre os dois equipamentos⁽³⁴⁾.

7.7.1. Citomegalovírus

No Laboratório de Patologia do Hospital de Braga são realizados neste equipamento testes de pesquisa de CMV, HCV e HBV, em articulação com o setor da virologia. No meu caso, pude assistir e realizar testes de deteção de DNA do Citomegalovírus (CMV). Esta deteção faz-se através do *kit LightCycler – Probes Master*, da Roche, que contém *primers* específicos para o DNA do CMV (*forward* e *reverse*), polimerase de DNA termoestável, sondas acopladas a fluoróforos e uma mistura de água, MgCl₂, tampão de reação e nucleótidos. Todos os reagentes mencionados são colocados no Cobas p 480, que vai adicioná-los às amostras e prepará-las para serem introduzidas no Cobas z 480, onde vão sofrer ciclos de amplificação e posterior leitura da fluorescência. Dependendo da intensidade da fluorescência vai poder ser considerada a presença, ou a ausência do DNA do CMV na amostra, sendo que esta intensidade varia com o tipo de amostra (soro, líquido amniótico, etc.)⁽³⁵⁾.

7.8. LightCycler[®] 2.0

Outro equipamento que permite a análise dos ácidos nucleicos após a extração é o LightCycler[®] 2.0, da Roche. Este equipamento realiza PCR em tempo real, tal como o LightCycler 480 II[®], mas também RT-PCR, para assim quantificar DNA, cDNA e RNA.

Este foi o equipamento que utilizei com maior frequência e que permite a amplificação dos ácidos nucleicos de 30 amostras, em simultâneo com um controlo e um branco, em capilares de vidro. A elevada proporção superfície volume providencia uma transferência de calor



Figura 43 - Equipamento LightCycler[®] 2.0, da Roche, para realização de PCR e RT-PCR.

mais rápida e eficaz, permitindo ciclos de temperatura mais rápidos. O Software LightCycler® recolhe a informação sobre a fluorescência de 6 canais em cada ciclo de temperatura, apresentando um gráfico no final dos ciclos de amplificação⁽³⁶⁾.

7.8.1. Vírus Varicela Zóster

Para a deteção do Vírus Varicela Zóster é utilizado o kit *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe* que inclui água, cloreto de magnésio, primers específicos para o DNA do VZV, sondas marcadas com fluoróforos e uma mistura com tampão de reação, polimerase e nucleótidos. O programa utilizado tem um ciclo de ativação da polimerase, seguido de cinquenta ciclos de amplificação e um de arrefecimento. Sendo posteriormente efetuada a leitura da fluorescência pelo equipamento⁽³⁷⁾.

7.8.2. Vírus Herpes Simplex

Para a deteção do Vírus Herpes Simplex é utilizado o kit *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe* que inclui água, cloreto de magnésio, primers específicos para o DNA do HSV, sondas marcadas com fluoróforos e uma mistura com tampão de reação, polimerase e nucleótidos. O programa utilizado é semelhante ao utilizado para o Vírus Varicela Zóster⁽³⁷⁾.

7.8.3. Lactase

Para a conferir a presença da enzima lactase é utilizado o kit *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe* que inclui água, cloreto de magnésio, primers específicos para a porção de DNA que codifica esta enzima, sondas marcadas com fluoróforos e uma mistura com tampão de reação, polimerase e nucleótidos. O programa utilizado é semelhante ao utilizado para o Vírus Varicela Zóster⁽³⁷⁾.

7.8.4. Mycobacterium tuberculosis

Em articulação com a micobacteriologia, procede-se à deteção do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* para confirmação do diagnóstico. Para isso utiliza-se o kit *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe* que inclui água, cloreto de magnésio, primers específicos para o DNA desta micobactéria, sondas marcadas com fluoróforos e uma mistura com tampão de reação, polimerase e nucleótidos. O programa utilizado tem um ciclo de ativação da polimerase, seguido de cinquenta ciclos de amplificação,

um ciclo de fusão (“*melting*”) e um de arrefecimento. Sendo posteriormente efetuada a leitura da fluorescência pelo equipamento^(37, 38).

7.8.5. Mutações do gene HFE

O gene HFE é responsável pela regulação do ferro humano, sendo que mutações associados a este gene podem levar ao desenvolvimento de hemocromatose hereditária do tipo 1, uma patologia ligada a hematologia. Sendo as mutações deste gene mais frequentemente associadas à hemocromatose a C282Y, a H63D e a S65C, estas são pesquisas utilizando o kit *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe* que inclui água, cloreto de magnésio, primers específicos para as mutações, sondas marcadas com fluoróforos e uma mistura com tampão de reação, polimerase e nucleótidos. O programa utilizado é semelhante ao utilizado para a enzima lactase^(37, 39).

8. Valência de Microbiologia

Responsável da área:

Dra. Alberta Faustino (Médica, Assistente Graduada)

Orientadores do estágio nesta valência:

Dra. Glória Gonçalves (Farmacêutica, Assistente Principal)

Dra. Alberta Faustino

Dra. Ana Raquel Vieira (Médica, Assistente Hospitalar)

Dra. Maria João Sousa (Farmacêutica, Assessora)

Período de estágio:

4 de julho a 5 de agosto de 2022

Atividades acompanhadas no período de estágio:

Receção das amostras previamente registadas

Triagem e avaliação da conformidade das amostras

Processamento e inoculação de amostras nos diferentes meios de cultivo de acordo com o produto e análise solicitada

Avaliação do crescimento nos diferentes meios de cultivo, valoração microbiológica e clínica

Elaboração de diferentes pedidos de processamento tais como identificação e avaliação da suscetibilidade aos fármacos adequados

Validação dos resultados obtidos no contexto microbiológico e clínico

Controlo de qualidade interno e externo

Número de amostras analisadas no período de estágio:

7 108

A Microbiologia é uma vasta área que estuda microrganismos e no laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga está dividida por setores: bacteriologia, parasitologia, micologia, virologia e micobacteriologia. De uma forma geral a minha passagem pela Microbiologia abarcou todos estes setores, tendo passado pela orientação de vários especialistas e acompanhado diferentes técnicos, quer na realização de diversos procedimentos, quer na utilização de vários equipamentos. No entanto, apesar de ter sido uma das áreas do meu estágio e ter enorme relevância dentro de um laboratório de análises clínicas, a Microbiologia corresponde à área de

desenvolvimento da minha monografia, pelo que não foi desenvolvida de uma forma tão extensa como as restantes áreas no formato de relatório de estágio.

A Microbiologia, enquanto área de estudo de vários tipos de microrganismos compreende a análise de diversos produtos biológicos, tais como urinas assépticas, fezes, sangue, expetorações, exsudados (nasais, faríngeos, nasofaríngeos, vaginais, retais, uretrais, purulentos), materiais de biópsia, etc. Os objetivos analíticos nesta área consistem no isolamento e identificação dos microrganismos patogénicos com interesse clínico, indicação da terapêutica mais adequada, através da realização de testes de suscetibilidade a fármacos, e ainda a realização da componente laboratorial dos rastreios microbiológicos, onde se identifica a presença de determinadas estirpes bacterianas de origem hospitalar.

O fluxo analítico da área de Microbiologia inicia-se com a triagem dos produtos biológicos, sendo que esta é a única área do laboratório cuja triagem acontece de forma independente das restantes áreas, uma vez que se pretende garantir a viabilidade dos microrganismos e evitar a contaminação das amostras. Após a triagem, as amostras são encaminhadas para os diferentes setores de acordo com o tipo de análise solicitado.

8.1. Bacteriologia

8.1.1. Exame Microscópico

O estudo microbiológico, na maioria dos setores, inclui o exame ao microscópio, que pode ser feito a fresco, ou com diferentes colorações, consoante o tipo de microrganismos que pretendemos estudar. Na bacteriologia o exame microscópico pode iniciar-se com o exame direto a fresco, no entanto, o exame microscópico mais relevante é o exame direto com coloração de Gram. Este exame permite caraterizar a flora da amostra, avaliando a presença, ou ausência de flora (amostras como o LCR são expectavelmente estéreis). Aquando da presença de flora permite a distinção entre flora comensal e a existência de uma flora predominante, bem como a sua caraterização. Assim, é feita a distinção entre bactérias Gram positivo (azul-púrpura) e Gram negativo (vermelho-rosa), mas também a determinação da morfologia celular (cocos e bacilos), tamanho e disposição das bactérias (linear, em cacho, etc.).

8.1.2. Exame cultural

Após a observação da amostra ao microscópio é realizada a pesquisa do agente através do exame cultural. Para isto e dependendo do microrganismo a isolar, são utilizados diferentes meios de cultura, com vista ao isolamento primário do microrganismo para posterior identificação. Estes meios podem ser líquidos, ou sólidos e dividem-se em:

- **Meios de transporte** – meios isentos de nutrientes, que mantêm o pH e previnem a desidratação da amostra durante o processo de transporte até ao laboratório (ex: meio de Stuart);
- **Meios não seletivos** – meios ricos em nutrientes que permitem o crescimento da flora da amostra de forma não seletiva (ex: gelose de sangue)
- **Meios de enriquecimento** – meios ricos em nutrientes, que estimulam o crescimento microbiano (ex: caldo de carne);
- **Meios seletivos** – meios que têm como finalidade selecionar determinados géneros/espécies impedindo o crescimento da restante flora da amostra (ex: meio agar SS, que permite a seleção de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*);
- **Meios diferenciais** – meios que possibilitam a distinção entre vários géneros/espécies, por possuírem substâncias que permitem a diferenciação através da cor ou morfologia das colónias (ex: meio de MacConkey, que permite o crescimento de bactérias gram negativo e distingue as bactérias fermentadoras da lactase – meio rosa – das bactérias não fermentadoras da lactase – meio amarelo)

Para além da seleção dos meios de cultura, é também importante que as condições de incubação sejam as corretas, nomeadamente o tipo de atmosfera (ex: microaerofílica, anaeróbia e aeróbia) e a temperatura. Após o tempo de incubação os meios de culturas são analisados, observando-se o número de colónias obtido, as suas características e predominância. Depois desta análise, os meios são encaminhados para os procedimentos de identificação mais adequados.

8.1.3. MALDI Biotyper® sirius IVD System

O MALDI Biotyper®, da Bruker, é um equipamento automatizado que permite a identificação de microrganismos através da técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight), que utiliza a espectroscopia de massa para detetar uma *fingerprint* proteómica característica de determinado organismo.

Para além da identificação das bactérias gram negativas e gram positivas, este equipamento tem ainda a capacidade de identificar alguns dos principais fungos associados à clínica, como é o caso da *Candida spp.*, tendo relevância, não só no setor da bacteriologia, como para o da micologia⁽⁴⁰⁾.



Figura 44 - Equipamento MALDI Biotyper®, da Bruker, para a identificação de microrganismos, através da técnica de MALDI-TOF. (40)

8.1.4. VITEK® 2 System

O VITEK® 2, da Biomérieux, é um equipamento automatizado, que realiza leituras turbidimétricas e colorimétricas, onde para além da identificação dos microrganismos, são também realizados testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA), através da técnica de microdiluição⁽⁴¹⁾.

Neste equipamento são utilizadas cartas de utilização única, que contêm substratos para a medição do crescimento microbiano e identificação dos microrganismos, bem como diferentes concentrações de antibióticos, para a realização do TSA. Após a realização desta primeira abordagem com os perfis de antibióticos comercializados e consoante os resultados obtidos, pode ser necessário o estudo adicional de outros antibióticos com relevância para a terapêutica, ou a confirmação de resultados dados pelo equipamento. Neste sentido, pode ser utilizado o teste de Kirby-Bauer (método de referência), ou as tiras E-teste.



Figura 45 - Equipamento VITEK® 2, da Biomérieux, para identificação de microrganismos e realização de TSA (41).

No teste de Kirby-Bauer são dispensados discos impregnados com os antibióticos em estudo sobre uma placa de agar inoculada com o agente bacteriano. Após incubação, são medidos os halos de inibição do crescimento bacteriano em torno dos discos e os valores obtidos (em mm) vão ser comparados com as tabelas disponibilizadas pelo Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST), que permitem



Figura 46 - Exemplo de placa de agar com discos , para realização do teste de Kirby-Bauer.

categorizar as estirpes em sensíveis e resistentes (podendo existir intervalos de valores intermédios que não permitem a categorização da estirpe em estudo)^(42, 43).

Podem ainda ser utilizadas tiras de E-teste, que permitem determinar a concentração mínima inibitória. Estas tiras contêm um gradiente de concentração de um determinado antibiótico e são aplicadas à superfície de uma placa de agar previamente inoculada. Após incubação, a leitura da concentração mínima inibitória é realizada no ponto em que o halo de inibição do crescimento microbiano



Figura 47 - Exemplo de placa de agar com tira de E-teste.

intersecta a tira. O valor obtido, tal como acontece com o teste de Kirby-Bauer, vai ser comparado com as tabelas do EUCAST, para caracterização da estirpe em sensível, ou resistente. Este teste permite ainda a adaptação da terapêutica consoante a concentração necessária para inibir o crescimento microbiano⁽⁴⁴⁾.

8.1.5. Testes imunocromatográficos

Os testes imunocromatográficos são testes de deteção rápida (principal característica para a sua utilização) onde um antigénio, ou um anticorpo são fixados numa matriz. O componente que pretendemos detetar vai ligar-se ao conjugado, que após a migração ao longo da matriz forma um imunocomplexo com o antigénio/anticorpo fixado nesta matriz, levando ao surgimento de cor. No setor da bacteriologia são realizados vários testes imunocromatográficos, nomeadamente para a deteção de:

- *Streptococcus A* – Kit Strep A Rapid Test Cassette, da Acro Biotech, Inc.;
- *Streptococcus pneumoniae* – Kit BinaxNOW™ *Streptococcus pneumoniae*, da Abbott;
- *Legionella pneumophila* – Kit BinaxNOW™ *Legionella* (urinary), da Abbott;

- Sangue oculto nas fezes – *Kit Fecal occult blood test*, da Laboquick (deteção de hemoglobina);
- *Trichomonas vaginalis* – Kit OSOM® *Trichomonas test*, da OSOM;
- *Helicobacter pylori* – Kit Biotline H.pylori Ag, da Abbott.

8.1.6. Rastreios Microbiológicos

A bacteriologia realiza também a componente laboratorial dos rastreios microbiológicos desenvolvidos pelo Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e Resistência aos Antimicrobianos do Hospital de Braga, onde se identifica a presença de determinadas estirpes bacterianas de origem hospitalar, permitindo a prevenção e o controlo da infeção transmitida por estas estirpes bacterianas. As duas estirpes rastreadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga, através do equipamento GeneXpert® XVI, são:

- **Enterobacterales Resistentes aos Carbapenemos (CRE)** – bactérias Gram negativo, resistentes a todos os β -lactâmicos (multirresistentes); esta resistência deve-se a dois mecanismos principais, a resistência adaptativa aos antibióticos e a presença de enzimas com capacidade de destruir os antibióticos de largo espetro, nomeadamente a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (mais comum em Portugal)
- ***Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA)** – bactérias coco Gram positivo, resistentes a todos os β -lactâmicos (multirresistentes) incluindo a meticilina;

8.2. Micologia

O diagnóstico micológico é realizado através da observação microscópica, exame cultural e identificação. Existem espécies que podem ser identificadas apenas através dos exames microscópico e cultural, no entanto, outras podem ser identificadas por alguns dos equipamentos presentes no laboratório, nomeadamente o MALDI Biotyper® e o VITEK® 2. Quando há suspeita da presença de um fungo, mas este não pode ser identificado por nenhum destes métodos, recorre-se à Biologia Molecular para sequenciação e identificação da espécie em causa.

8.2.1. Exame Microscópico

No exame microscópico é realizado o exame direto a fresco para pesquisa de fungos, tanto filamentosos, como leveduriformes, sendo avaliadas as suas características morfológicas (ex: presença de hifas, esporos, tipo de conidiogénese, etc.).

8.2.2. Exame cultural

Em complemento ao exame microscópico, podem ser utilizados meios de cultura que promovem o crescimento fúngico (ex: meio de Sabouraud) e que permitem avaliar as características morfológicas da colónia (ex: cor, tamanho, textura, cor do meio, etc.) e facilitam a realização de técnicas de visualização ao microscópio (ex: técnica da fita cola). Assim, a reunião das características morfológicas obtidas nos exames microscópico e cultural, permitem a identificação taxonómica do fungo.

8.3. Parasitologia

8.3.1. Exame Microscópico

O estudo dos parasitas é também uma área importante da Microbiologia, sendo que pode acompanhar a pesquisa de ovos de parasitas e protozoários, nas fezes, na área da Microbiologia e a pesquisa de anticorpos contra alguns parasitas na área da Imunologia. Assim, quando é pedido o estudo parasitológico é realizado o método de concentração por sedimentação, através do kit da Epitope Diagnostics, Inc., que permite aumentar a probabilidade de encontrar parasitas na preparação, enquanto elimina a maior parte do conteúdo orgânico fecal. A amostra obtida (sedimento) após este método vai ser observada ao microscópio, em exame direto, sendo o parasita mais comumente encontrado a *Giardia intestinalis*, um protozoário flagelado encontrado nas fezes.

8.4. Virologia

A virologia é o setor da microbiologia dedicado ao estudo dos vírus, no entanto, este setor encontra-se em articulação direta com as áreas da Biologia Molecular e da Imunologia. Realiza-se na virologia a deteção de vírus respiratórios, através dos

equipamentos Finnish mariPOC® e GeneXpert® XVI, e de *Adenovírus* e *Rotavírus*, através de testes imunocromatográficos.

8.4.1. Finnish mariPOC®

O Finnish mariPOC®, da ArcDia, é um sistema automatizado utilizado no setor da virologia para a deteção rápida de antígenos dos 11 principais vírus respiratórios, inclusive, os vírus *Influenza* e *SARS-CoV2*. No entanto, a sensibilidade deste tipo de teste para cargas virais mais baixas não é muito elevada (84,4% - 92,3%)⁽⁴⁵⁾, sendo necessário, sempre que a clínica o justifique a confirmação de resultados negativos por métodos da área da Biologia Molecular, nomeadamente testes de PCR⁽⁴⁶⁾.



Figura 48 - Equipamento Finnish mariPOC, da ArcDia, utilizado para deteção antigénica de vírus respiratórios (46).

8.4.2. GeneXpert® XVI

O GeneXpert® XVI, da Cepheid, é um sistema automatizado que executa testes de PCR em 16 amostras em simultâneo. Neste equipamento, tal como no anterior, é possível a deteção diferencial de vírus respiratórios, sendo que neste caso faz-se a distinção entre *SARS-CoV-2*, *Influenza A*, *Influenza B* e *Vírus Sincicial Respiratório*.

Para além de ser utilizado no setor da virologia, este equipamento é utilizado, nos rastreios microbiológicos realizados na bacteriologia, para a deteção de MRSA e deteção e diferenciação das enzimas presentes nas CRE: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), New Delhi metalo-beta-lactamase (NDM), Verona metalo-beta-lactamase (VIM), Imipenemase (IMP) e Oxacilinase (OXA-48)⁽⁴⁷⁾.



Figura 49 - Equipamento GeneXpert® XVI, da Cepheid, para deteção de vírus respiratórios e rastreios microbiológicos, através de PCR (47).

8.4.3. Testes imunocromatográficos

Como já mencionado, no setor da virologia utiliza-se um teste imunocromatográfico para a deteção de antígeno de *Rotavírus* e *Adenovírus*, sendo que este teste imunocromatográfico pertence ao Kit *Rotavírus+Adenovírus*, da CerTest.

8.5. Micobacteriologia

O setor da Micobacteriologia estuda o género *Mycobacterium*, sendo o seu principal agente patogénico o *Mycobacterium tuberculosis*. Pelas suas características de crescimento e principalmente pelo risco biológico de nível 3 este setor funciona numa sala de contenção biológica de nível 3 (unidade separada da restante área laboratorial por antecâmara e atmosfera em pressão negativa).

8.5.1. Exame Microscópico

A pesquisa de micobactérias realiza-se em todos os produtos biológicos, podendo ser feita a divisão em produtos pulmonares (ex: expetoração, LBA, etc.) e extrapulmonares (ex: líquidos biológicos, material de biópsia, etc.). Apesar da divisão todas as amostras vão sofrer uma preparação prévia ao exame microscópico, sendo que esta preparação inclui um processo de descontaminação, concentração e homogeneização. Após a preparação das amostras são realizados esfregaços em lâmina, que vão posteriormente ser corados, para a pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes. Esta coloração pode ser feita com coloração de Auramina-Vermelho de Tiazina (fundo vermelho-escuro, com bacilos amarelo fluorescente) e/ou com coloração de Ziehl-Neelsen (fundo azul, com bacilos álcool-ácido resistentes rosa-púrpura).

8.5.2. Exame Cultural

Na micobacteriologia o exame cultural é de extrema importância, uma vez que nos permite o isolamento primário das micobactérias para posterior estudo e identificação. Neste sentido são utilizados dois meios seletivos, um meio sólido (Lowenstein-Jensen) e um meio líquido (BBL MGIT), sendo que o meio sólido vai ser incubado de forma manual, em estufas ($35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), e o meio líquido vai ser incubado no equipamento BD BACTEC™ MGIT 960.

8.5.3. BD BACTEC™ MGIT™ 960

O BD BACTEC™ MGIT 960 é um equipamento semi-automatizado de incubação e monitorização do crescimento de micobactérias, com 960 posições. Este equipamento realiza a monitorização do oxigénio nos tubos de cultura BD BACTEC™ MGIT™, através da medição de um composto fluorescente. O consumo de oxigénio (aumento do crescimento microbiano) está associado ao aumento da deteção de fluorescência⁽⁴⁸⁾.



Figura 50 - Equipamento BD BACTEC MGIT 960, para incubação, monitorização do crescimento e teste de sensibilidade a fármacos de micobactérias (48).

Para além da incubação dos meios de cultura e da monitorização do crescimento microbiano, é também realizado neste equipamento o teste de sensibilidade aos fármacos, para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* em meio líquido, através do método das proporções. Este teste de sensibilidade abrange os fármacos de primeira linha, nomeadamente a Isoniazida, a Rifampicina, o Etambutol e a Pirazinamida.

No caso das micobactérias não tuberculosas é utilizado o kit GenoType® NTM-DR, da HAIN Lifescience, para deteção de genes de resistência a macrólidos e aminoglicosídeos⁽⁴⁹⁾.

8.5.4. Testes imunocromatográficos

No setor das micobactérias é também utilizado um teste imunocromatográfico, o Biotest™ TB Ag MPT64, da Abott, que deteta a proteína MPT64, secretada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, este teste é utilizado para a identificação rápida do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, pós cultura positiva, com uma especificidade de 100%. No entanto, uma vez que a sensibilidade do teste é de 98,6%, o mesmo não pode confirmar um resultado negativo, sendo necessários testes adicionais para validação deste resultado⁽⁵⁰⁾.

8.5.5. Estudos genéticos

Tal como acontece em outros setores da microbiologia, a pesquisa de micobactérias obriga a uma estreita relação com a Biologia Molecular, que realiza, sempre que necessário, a deteção do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

(diretamente na amostra, ou após cultura positiva), bem como a deteção de genes de resistência à Rifampicina e Isoniazida, através de PCR em tempo real.

No setor da micobacteriologia são ainda realizados testes genéticos que utilizam técnicas de PCR para a identificação da espécie das bactérias não tuberculosas. Para identificação das 27 micobactérias não tuberculosas mais frequentes é utilizado o kit GenoType Mycobacterium CM, da HAIN Lifescience. Quando a espécie não pode ser identificada através deste kit, é utilizado o kit GenoType Mycobacterium AS, também da HAIN Lifescience, que tem a capacidade de identificar mais 16 espécies de micobactérias não tuberculosas, designadas micobactérias atípicas.

Está ainda disponível o Kit GenoType Mycobacterium MTBC, da HAIN Lifescience, que permite distinguir *Mycobacterium tuberculosis* de *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium canettii*, sendo utilizado em casos específicos, nomeadamente no caso de isolamentos em suspeitas de BCGite, terapêuticas oncológicas com estirpe BCG e em situações de indivíduos provenientes de zonas com contexto epidemiológico associado a estas estirpes (África ou Ásia). No entanto, não é habitualmente utilizado dada a prevalência de *Mycobacterium tuberculosis* na população portuguesa e a abordagem terapêutica a seguir.

9. Controlo de qualidade

Para garantir a qualidade dos resultados fornecidos é necessário exercer práticas que garantam controlo desse qualidade. Para isso é realizado o controlo de qualidade interno e a avaliação externa da qualidade.

9.1. Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno (CQI) corresponde a um conjunto de procedimentos implementados pelo laboratório com a finalidade de garantir a qualidade e fiabilidade dos resultados obtidos nas análises laboratoriais. Assim, através deste sistema de controlo é possível detetar erros e corrigi-los.

Para todos os parâmetros dos equipamentos que foram falados no decorrer do relatório de estágio existem controlos de origem comercial, que são utilizados no início de cada dia de trabalho do equipamento, mas também sempre que exista manutenção do equipamento, mudança de lote de reagentes e consumíveis, ou qualquer outro fator que assim o justifique. Estes controlos podem ter um nível (ex: testes imunocromatográficos), dois níveis (normal e patológico), ou três níveis (normal, baixo e alto), dependendo do equipamento, têm uma concentração conhecida e são compostos por uma matriz biológica semelhante à das amostras processadas.

Os controlos com vários níveis são utilizados de forma intercalada e processados nas mesmas condições que as amostras dos doentes. Os resultados obtidos por este sistema de controlo interno são dispersos numa carta de controlo e avaliados por comparação com os restantes pontos, bem como com o intervalo de concentração esperado, segundo as regras de *Westgard*, permitindo que seja tomada sempre a mesma decisão sobre a validade dos resultados analíticos.

Nos kits de testes imunocromatográficos, o controlo de qualidade vem, geralmente, inserido no próprio teste e assegura que o teste está a funcionar corretamente, invalidando os resultados sempre que este não esteja de acordo com o esperado.

Existem ainda outras formas de avaliar a qualidade interna do laboratório, tal como inquéritos de satisfação ao utente e aos profissionais do serviço, bem como a utilização de amostras de doentes mistério. Estas técnicas de avaliação da qualidade são realizadas de forma mais esporádica e funcionam como um complemento à análise dos controlos, sendo particularmente úteis no controlo da fase pré-analítica.

9.2. Avaliação Externa da Qualidade

Para além do controlo de qualidade interno, todos os laboratórios de análises clínicas devem estar inscritos em programas de avaliação externa da qualidade (AEQ), que permitem aferir a exatidão dos resultados obtidos nas análises laboratoriais.

Dependendo da área o laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga encontra-se inscrito em diversos programas de avaliação externa da qualidade, nomeadamente o UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*), o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*), o SQAS (*Safety and Quality Assessment for Sustainability*) e o LABQUALITY. Estas entidades externas enviam periodicamente amostras (a periodicidade depende do ensaio), cujo conteúdo não é dado a conhecer aos participantes, com o intuito que estas sejam processadas nas mesmas condições que as amostras dos doentes e os resultados enviados à respetiva entidade. Estes programas são internacionais e comparam os resultados dos vários participantes a nível mundial, emitindo um boletim com a comparação do desempenho do laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga, com o desempenho dos restantes laboratórios e com o esperado para aquela amostra.

Tabela 6 - Programas de avaliação externa da qualidade em que o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Braga se encontra a participar

Área	Programa	Área	Programa
Hematologia	UK NEQAS ⁽⁵¹⁾	Química Clínica	UK NEQAS
	RIQAS ⁽⁵²⁾		RIQAS
	SQAS ⁽⁵³⁾	Imunologia	UK NEQAS
	LABQUALITY ⁽⁵⁴⁾		RIQAS
Biologia Molecular	UK NEQAS	Microbiologia	UK NEQAS

10. Conclusão

O estágio curricular que realizei no serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga como parte integrante do mestrado em Análises Clínicas permitiu-me consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos durante a primeira parte do mestrado e aplicá-los, bem como desenvolver capacidades técnicas. Estagiar em ambiente hospitalar revelou-se uma experiência muito enriquecedora, uma vez que tive contacto com um espectro mais alargado de amostras, conheci outras áreas laboratoriais (Anatomia Patológica e Imunohistoquímica) e tive uma experiência complementar às minhas experiências laboratoriais anteriores. Ao mesmo tempo pude integrar a rotina laboratorial, manuseando os mais diversos equipamentos e tendo uma equipa de profissionais incansáveis que expandiram o meu conhecimento à medida que me integravam nas suas atividades de rotina.

Este estágio permitiu-me ainda ter uma visão mais clara de como todas as áreas do laboratório estão interligadas, desde a fase pré-analítica, passando por todas as áreas da fase analítica, até à fase pós-analítica, e como há sempre espaço para melhorias qualquer que seja a área.

Os objetivos iniciais propostos para este estágio foram largamente ultrapassados, com principal foco na prática de técnicas laboratoriais, na validação biopatológica e no conhecimento sobre o sistema de qualidade implementado, mas também desenvolvendo outro tipo de atividades de cariz científico, como a apresentação de um artigo científico, a discussão de casos clínicos, a organização de uma laminoteca e a implementação de diagramas de diagnóstico.

Parte II

1. Introdução

O vírus Zika é um arbovírus que foi isolado pela primeira vez no sangue de um macaco *Rhesus* no Uganda, em 1947, tendo passado despercebido nos anos que se seguiram. No entanto, no início de 2013 provocou um surto de maiores dimensões na Polinésia Francesa, e, devido à rápida propagação para o Brasil e para o restante continente americano, ganhou destaque a nível mundial tendo sido declarado como uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional pela Organização Mundial de Saúde, em 2016⁽⁵⁵⁾.

A infeção por este vírus mantém-se uma preocupação atual, estando bastante presente no continente americano e no sudeste asiático e havendo casos reportados na Europa, nomeadamente em França. Em Portugal, foram reportados os primeiros casos em junho de 2015, não havendo atualmente reporte de transmissão ativa⁽⁵⁶⁾.

Ao nível da infeção em adultos, os indivíduos infetados pelo vírus Zika são geralmente assintomáticos, ou desenvolvem sintomas ligeiros *Influenza-like*, sendo o diagnóstico realizado através da deteção do RNA do vírus por Reação de Polimerização em Cadeia após Transcrição Reversa (RT-PCR), ou através da deteção de anticorpos IgM e IgG por Ensaio Imunoenzimático por Absorção em fase sólida (ELISA)⁽⁵⁷⁾. Apesar de assintomáticas, as mulheres grávidas infetadas podem transmitir o vírus aos seus fetos, levando a complicações que despertaram o interesse da comunidade científica⁽⁵⁸⁾. A Síndrome Congénita pelo vírus Zika (SCZ), como é conhecida, advém do tropismo deste vírus para o sistema nervoso em desenvolvimento e engloba alterações morfológicas do crânio e anomalias cerebrais, oculares e motoras, que muitas vezes podem ser detetadas por exames de imagem durante a gestação⁽⁵⁹⁾.

Dependendo das anomalias desenvolvidas durante a gravidez, tanto a nível cerebral, como ocular e articular, podem desenvolver-se sequelas com diversos graus de gravidade. Assim, alguns dos recém nascidos permanecerão assintomáticos, outros desenvolverão sintomas *minor* e haverá alguns que poderão ter acentuados atrasos no desenvolvimento, tanto motor, como cognitivo⁽⁶⁰⁾.

Tendo isto em mente, tornou-se essencial perceber os mecanismos patogénicos associados à infeção congénita pelo vírus Zika, de modo a ser possível o desenvolvimento de protocolos farmacológicos adequados ao tratamento dos vários tipos de sequelas, bem como de vacinas, que permitam a proteção contra a transmissão do vírus, principalmente entre as gestantes e os fetos. Estes mecanismos têm vindo a ser elucidados nos últimos anos, tendo havido um aumento substancial do

conhecimento acerca deste vírus no decorrer do último ano. Assim, a realização de uma revisão sistemática, que conjugue o conhecimento disponível no presente momento, tornou-se altamente relevante. A pertinência do tema conjugada com o meu interesse pela saúde materno-infantil, levou ao desenvolvimento desta revisão como parte integrante da minha dissertação de mestrado.

2. Vírus Zika

O vírus Zika é um arbovírus da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*, que foi isolado pela primeira vez num macaco *Rhesus* na floresta Zika no Uganda, em 1947, durante um estudo sobre a Febre Amarela⁽⁶¹⁾. É constituído por ácido ribonucleico de cadeia simples, com polaridade positiva, com aproximadamente 10,7 Kb⁽⁶²⁾, que é transcrito numa poliproteína constituída por três proteínas estruturais (invólucro - E, precursor da membrana - PrM e cápside - C), que medeiam a entrada do vírus nas células, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), necessárias à replicação viral e ao processamento da poliproteína^(58, 63, 64).

Após a descoberta no Uganda (linhagem africana), a infeção por ZIKV em humanos foi reportada pela primeira vez na Nigéria, em 1952⁽⁶⁵⁾. Mais tarde, nos anos 60, foram reportados casos na Ásia (linhagem asiática), porém sempre casos esporádicos. O primeiro surto foi reportado meio século mais tarde, em 2007, nas ilhas Yap, na Micronésia, tendo infetado 75% da população. Seis anos mais tarde, em 2013, ocorreu um segundo surto na Polinésia Francesa, que afetou 50% da população do país, tendo sido associada pela primeira vez a infeção pelo ZIKV à síndrome de Guillain-Barré⁽⁶⁶⁾. O ZIKV espalhou-se por outras ilhas do Pacífico atingindo a América do Sul em 2015, com o primeiro caso reportado no Brasil pertencente à linhagem asiática⁽⁵⁸⁾. A entrada da linhagem asiática no continente americano correspondeu a grandes alterações do genoma do ZIKV, sendo que essas alterações foram associadas a efeitos mais adversos nas células progenitoras neuronais e a uma maior proliferação do vírus⁽⁶³⁾.

A ligação entre a infeção por ZIKV e a microcefalia foi reportada pela primeira vez no final de 2015, no Brasil, associada ao aumento dos casos de microcefalia na região mais afetada pelo vírus⁽⁶⁵⁾. De acordo com o Sistema de Informações de Nascidos Vivos Brasileiro (SINASC), a prevalência de microcefalia entre 2000 e 2014, antes da circulação do ZIKV, era de 5,5 por 100 000 nados vivos, enquanto, em 2015, após a introdução do vírus no país, passou a ser de 54,6 por 100 000 nados vivos, havendo um aumento de 9,8 vezes⁽⁵⁵⁾.

Devido à rápida propagação no Brasil e restante continente americano, a infeção por ZIKV ganhou destaque a nível mundial tendo sido declarada como Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional pela Organização Mundial de Saúde, em Fevereiro de 2016⁽⁵⁵⁾. Segundo a mesma, o pico de incidência da infeção pelo vírus Zika

no continente americano deu-se em 2016 e teve um declínio significativo até aos dias de hoje, continuando a haver relatos de pequenos surtos⁽⁶⁷⁾.

Em Portugal foram reportados os primeiros casos em junho de 2015, num casal que havia retornado de uma viagem ao nordeste do Brasil (estado de Ceará) e que desenvolveu febre, artralgias e rash cutâneo. Foi realizada serologia para *Dengue*, Zika e Chikungunya, tendo sido relatado resultado positivo para anticorpos IgM contra o vírus Zika nos dois indivíduos⁽⁵⁶⁾. Atualmente, apesar da existência de casos esporádicos de viajantes que regressam de regiões endémicas, não há reporte de casos de transmissão autóctone do vírus Zika em Portugal, apesar da existência do vetor estar estabelecida e das relações próximas entre Portugal e o Brasil. A transmissão ativa do vírus Zika mantém-se em 89 países, predominantemente nos continentes americano e asiático, sendo que na Europa apenas a França faz parte da lista de países com transmissão ativa⁽⁶⁸⁾.

A maioria dos países com elevado risco de transmissão do ZIKV têm meios laboratoriais escassos para a deteção do vírus, bem como acesso limitado aos cuidados de saúde reprodutiva, dois contributos para que o risco de transmissão se mantenha elevado⁽⁶⁹⁾.

3. Mecanismos de transmissão

A maioria dos arbovírus causa zoonoses que geralmente dependem de espécies animais não humanas para manutenção na natureza, sendo que estes animais são conhecidos como reservatórios. Os humanos, na maioria das vezes, são hospedeiros acidentais e terminais, não se mantendo o ciclo vetor-humano-vetor necessário à sobrevivência do vírus⁽⁷⁰⁾. No caso do vírus Zika este ciclo mantém-se, sendo que a transmissão vetorial não é o único tipo de transmissão do vírus, tendo sido reportada a transmissão sexual, placentária, por transfusão, por transplantação e pelas secreções oculares^(70, 71).

3.1. Transmissão vetorial

A transmissão vetorial, tanto no vírus Zika, como nos restantes arbovírus é o principal modo de transmissão⁽⁵⁸⁾. O vetor dos arbovírus é um artrópode que transmite o vírus entre vertebrados através da injeção de saliva durante a sua refeição de sangue⁽⁷⁰⁾. No caso do vírus Zika a transmissão é realizada por mosquitos fêmea do género *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti*, apesar dos surtos da Micronésia e da Polinésia Francesa terem como principais vetores o *Aedes hensilli* e o *Aedes polynesiensis*, respetivamente.

O primeiro estudo a demonstrar que mosquitos deste género infetados por ZIKV podiam infetar um macaco foi conduzido em 1956 e mostrou que o ZIKV pode permanecer no vetor durante 10 semanas⁽⁷²⁾. Uma vez que o *Aedes aegypti* está presente em todas as regiões tropicais e sub-tropicais do mundo e o vírus pode permanecer no mosquito por tanto tempo, estas regiões tornam-se propícias ao aparecimento de novos surtos⁽⁵⁸⁾.

Outras espécies de mosquito, nomeadamente a *Culex spp.* foram reportadas como possíveis hospedeiros do ZIKV, no entanto a habilidade de transmitir o vírus a humanos não foi relatada⁽⁵⁸⁾.

Para a maioria dos flavivírus o homem é um hospedeiro final e acidental, no entanto, no caso do ZIKV a transmissão entre humanos é possível, podendo ser tanto sexual, como não sexual, o que torna mais fácil a transmissão intercontinental⁽⁶⁶⁾.

3.2. Transmissão sexual

O ZIKV parece ser o único arbovírus com transmissão sexual relatada. Sendo que teve o seu primeiro caso reportado em 2008, quando um cientista, que havia estado numa área endémica (Senegal), infetou a sua companheira, que vivia numa região sem vetores de transmissão (EUA)⁽⁷³⁾. Mais tarde foram descritas outras transmissões, tanto em casais heterossexuais, como homossexuais⁽⁵⁸⁾. A maioria dos casos de transmissão sexual do vírus Zika descritos na literatura são de um homem sintomático para uma mulher, no entanto também se encontra descrita a transmissão a partir de homens e mulheres assintomáticos⁽⁷²⁾.

O RNA do ZIKV pode ser detetado em amostras de sémen de indivíduos do sexo masculino após vários meses de infeção, no entanto, as partículas virais infecciosas parecem estar limitadas às primeiras semanas de infeção. Assim, a presença de RNA no sémen não determina a infecciosidade do indivíduo. No caso das mulheres, a presença de RNA nas secreções vaginais é rara (cerca de 2%)⁽⁵⁸⁾, para além de que o período de deteção de RNA nas mulheres (mediana de 14 dias) também é menor do que nos homens (mediana de 40 dias), tornando a transmissão sexual por mulheres menos provável do que por homens. Foi ainda demonstrada a suscetibilidade das mucosas retais e orais à infeção pelo ZIKV, tornando possível a transmissão do vírus através de sexo anal e oral^(72, 73). Neste contexto, o Centro de Controlo e Prevenção de Doença aconselha o uso de preservativos durante 3 meses após o retorno de áreas endémicas, por parte dos homens, e a espera de 2 meses para tentativa de conceção, por parte das mulheres⁽⁵⁸⁾. Para além do risco de transmissão nos primeiros 2 meses, por parte da mulher, a fertilidade masculina nesses mesmos 2 meses encontra-se alterada. O testículo, embora seja um órgão imunoprivilegiado, protegido pela barreira hematotesticular, pode ser infetado por agentes patogénicos como o ZIKV, que têm a capacidade de persistir no trato genital masculino. Durante a infeção pelo ZIKV há evidência da diminuição da contagem de espermatozoides entre o dia 7 e o dia 60 após a infeção, bem como da diminuição da motilidade dos mesmos. Após o dia 60, há um aumento da espermiogénese, que se traduz num aumento da contagem de espermatozoides até ser atingido o nível anterior à infeção (dia 120). O ZIKV tem capacidade de infetar tanto as células de Sertoli, como as espermatogónias podendo associar-se a problemas na fertilidade masculina, no entanto, são necessários mais estudos para confirmar esta possibilidade^(58, 73).

3.3. Transmissão placentária

No âmbito desta dissertação, a transmissão placentária é a forma de transmissão com maior relevância, embora não seja a mais prevalente, nem a que possui mais informação, sendo necessários mais estudos para compreender melhor este processo de transmissão. No entanto, estima-se que a transmissão materno-fetal ocorra em 20 a 30% das grávidas infetadas e que a infeção no primeiro trimestre de gravidez apresente um maior risco de desenvolvimento da Síndrome Congénita pelo vírus Zika^(58, 72).

A transmissão placentária já tinha sido estudada previamente noutros flavivírus. No entanto, como esses flavivírus causam *surtos* relativamente pequenos e circunscritos geograficamente, a relevância da infeção congénita nunca tinha sido bem definida. A epidemia causada pelo ZIKV no continente americano levou ao estudo mais aprofundado desta forma de transmissão e das consequências a ela associadas⁽⁶⁶⁾.

A patogénese da transmissão do ZIKV através da placenta decorre de um período de inflamação da placenta (placentite), em que o vírus Zika induz dano vascular e piroptose no tecido placentário⁽⁷²⁾, levando à infeção, replicação nos macrófagos e citotrofoblastos e à destruição da barreira imunológica placentária, o que vai facilitar a transferência viral da placenta para o sangue fetal, sendo que o RNA do vírus pode ser detetado, tanto na placenta, como no cérebro de fetos que terminaram em perda gestacional⁽⁶¹⁾. Ao contrário dos agentes patogénicos TORCH, o vírus Zika não causa uma resposta inflamatória massiva na placenta, mas induz danos graves quando consegue atingir o cérebro fetal, devido ao seu neurotropismo⁽⁷³⁾.

Sabe-se ainda que a existência de sintomas, bem como a gravidade destes na gestante não está relacionada com a probabilidade de transmissão da infeção, perda gestacional, ou desenvolvimento de anormalidades no feto⁽⁶¹⁾. Põe-se ainda a hipótese de poder haver transmissão durante o parto, através do contacto das mucosas do recém-nascido com as secreções genitais da gestante, bem como a possibilidade da transmissão do vírus através do leite materno, na amamentação. No entanto, a hipótese de transmissão durante o parto não se encontra fundamentada^(58, 72). No caso da transmissão através do leite materno, a Organização Mundial de Saúde decidiu que o potencial risco de transmissão do vírus Zika não supera os benefícios associados à amamentação, pelo que não foi imposta nenhuma contra-indicação referente à amamentação por mães infetadas com o vírus Zika⁽⁷⁴⁾.

4. Infecção congénita pelo vírus Zika – mecanismos patogénicos

A infecção congénita pelo vírus Zika, que ocorre através da transmissão placentária, foi associada a várias anomalias congénitas, apresentando potencial dano para diferentes órgãos, no entanto, estudos demonstraram que o ZIKV infeta preferencialmente células progenitoras do tecido neurológico, bem como macrófagos e trofoblastos da placenta. Assim, há dois alvos principais do vírus Zika que estão associados ao prognóstico dos fetos infetados pelo vírus Zika, o sistema neurológico e as células placentárias⁽⁷⁵⁾.

Independentemente do tipo de célula infetado pelo vírus Zika, este vai sofrer replicação e disseminar-se para outras células permissivas à sua entrada, sendo que esta entrada nas células está associada à interação da proteína estrutural EDIII (Envelope Protein Domain III) do ZIKV com recetores membranares das células a serem infetadas, como é o caso do AXL (ex: células progenitoras neuronais), do TYRO3 (ex: células endoteliais placentárias), do DC-SIGN (ex: células dendríticas e macrófagos) e do TIM-1 (ex: trofoblastos e células endoteliais da retina)^(71, 76).

O recetor AXL está presente em determinadas células, como é o caso das células da glia radial, astrócitos e nas células progenitoras da retina neural e é o recetor mais associado à entrada do ZIKV nas células⁽⁷⁷⁾. Para isso, o vírus é recrutado para o recetor AXL através do ligando Gas6 (*growth arrest specific 6*), o que resulta na sua internalização através de endocitose mediada por clatrina⁽⁶²⁾. Após a endocitose, o complexo ZIKV/Gas6 vai ativar a AXL cinase, que induz a transcrição de vários genes, nomeadamente TLR3 (*TOLL-like receptor 3*), DDX58 (*DExD/H-Box helicase 58*), IFIH1 (*Interferon induced with helicase c domain 1*) e ISGs (*Interferon-stimulated genes*), levando à supressão da resposta imune inata e consequente proliferação da infeção⁽⁷⁸⁾. Apesar das células que expressam o recetor AXL demonstrarem particular vulnerabilidade à infeção pelo ZIKV este recetor celular não é indispensável à entrada do vírus Zika nas células. No entanto, a sua supressão, ou inibição, está associada a uma diminuição da patogenicidade, bem como à redução da produção de citocinas inflamatórias e da piroptose⁽⁷⁹⁾.

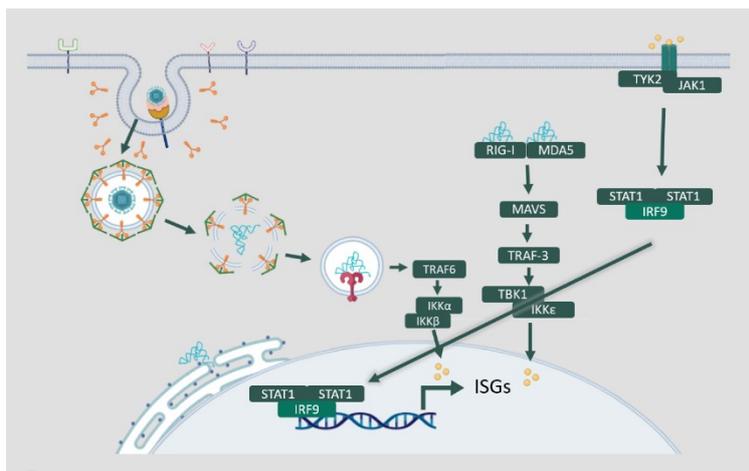


Figura 51 – Via de entrada do vírus Zika nas células e vias de produção de interferões e ativação de genes estimulados pelos interferões (ISGs). (Adaptado de: 62, 71, 77, 78 e 79)

Após a entrada do vírus nas células por endocitose a cápside é degradada e o RNA é libertado no retículo endoplasmático. Os ribossomos do retículo endoplasmático vão então proceder à transcrição do RNA, levando ao processamento da poliproteína transcrita e dando origem às proteínas estruturais e não estruturais do ZIKV.⁽⁷⁴⁾ Esta entrada nas células do hospedeiro vai levar à detecção de PAMPs (pattern associated molecular patterns) expressos pelo ZIKV, por recetores específicos reconhecedores dos PAMPs (PRRs), como é o caso do TLR3, do RIG-I (Retinoic acid-inducible gene I receptor) e do MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5), que vão desencadear uma resposta imunitária inata, mediada pelos interferões, os principais inibidores da replicação do ZIKV^(62, 71, 74). Os interferões do tipo I (IFN α e IFN β), produzidos pelas células infetadas pelo ZIKV, ligam-se a recetores específicos (IFNAR1 e IFNAR2) que vão ativar as proteínas JAK1 e TYK2, que levam à fosforilação e dimerização das moléculas STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) e STAT2 (signal transducer and activator of transcription 2), respetivamente^(64, 71). Já os interferões do tipo II (IFN γ) quando ligados aos seus recetores vão promover o recrutamento de JAK1 e JAK2, levando à fosforilação das moléculas STAT1.

As moléculas STAT1 e STAT2 fosforiladas formam homodímeros, ou dímeros STAT1-STAT2, que vão formar um complexo com o fator IRF9 (Interferon regulatory factor 9) chamado fator dos genes estimulados pelos interferões 3 (ISGF3)⁽⁶⁴⁾. Este complexo vai ser translocado para o núcleo das células, onde vai reconhecer o promotor ISRE, responsável pela transcrição dos genes estimulados pelos interferões (ISGs), levando à produção de um grande número de proteínas inibidoras da replicação viral, conduzindo a um estado celular antiviral^(64, 78, 80).

No caso dos homodímeros formados por moléculas fosforiladas STAT1, estes vão ser translocados para o núcleo, ligando-se às sequências de ativação gamma (GAS) e estimulando também a transcrição de ISGs⁽⁶⁴⁾.

O vírus Zika, tal como outros flavivírus, vai tentar escapar à resposta imunológica do hospedeiro, sendo que para isso há vários processos a decorrer em simultâneo, que podem ser ligeiramente diferentes consoante a estirpe. No entanto, de uma forma geral a proteína não estrutural NS5 vai impedir a fosforilação da molécula STAT2 e promover a sua degradação, o complexo NS2B3 vai impedir a fosforilação da molécula STAT1 através da clivagem da molécula JAK1 e as moléculas não estruturais NS1, NS2B e NS4B vão bloquear a ativação dos interferões do tipo I, impedindo a ativação dos genes estimulados pelos interferões (ISGs) e a criação de um microambiente antiviral^(71, 80). Finalmente a proteína NS2A impede a produção de interferões (tipo I e tipo II), que vão impedir a fosforilação do STAT1 e do STAT2, o que suprime a ativação dos promotores ISRE e GAS e, conseqüentemente, a transcrição dos genes estimulados pelos interferões (ISGs)⁽⁶⁴⁾.

Para além dos interferões do tipo I, há a libertação de interferões do tipo II, pelas células *natural killer* (NK), que vão inibir a replicação viral, ativar os macrófagos e facilitar a capacidade de apresentar antígenos das células dendríticas^(78, 80). Os interferões do tipo II vão ainda induzir uma resposta imunológica adaptativa com intervenção das células B e T⁽⁷¹⁾. Para isso, os interferões do tipo II vão ativar as células T CD4+ em células Th1, que vão secretar IL-2, IFN γ e TNF α , e as células T CD8+, que vão mediar a citólise das células infetadas pelo ZIKV, através de grânulos de perforina e granzima, e secretar IFN γ e TNF α .

Esta resposta humoral vai levar á produção de anticorpos contra as proteínas do ZIKV, sendo que os anticorpos contra as proteínas estruturais e em particular contra a proteína EDIII (Envelope Protein Domain III) têm maior capacidade de neutralizar o vírus⁽⁷¹⁾.

4.1. Infeção placentária

Uma vez que a placenta é um órgão fundamental para o crescimento e desenvolvimento fetal é importante começarmos por perceber como é afetada pela infeção pelo ZIKV. O vírus Zika tem capacidade de infetar células da placenta, levando à piroptose dos trofoblastos e ao dano das células endoteliais vasculares, o que altera a arquitetura da placenta e afeta o seu funcionamento. Este dano acontece através da

indução da piroptose, uma resposta imune inata contra patógenos intracelulares, inflamatória e que resulta na morte celular programada das células infetadas⁽⁷⁵⁾.

Aquando da infeção dos trofoblastos da placenta pelo ZIKV há detecção do genoma viral pelo RIG-I, um recetor celular, que promove a libertação de TNF α . O TNF α é crucial para a ativação da via apoptótica extrínseca, nomeadamente na ativação da caspase-8. A caspase-3, quando ativada pela caspase-8, vai ativar a GSDME (gasdermina E), sendo que o domínio N-terminal da gasdermina E se vai ligar a componentes da membrana celular permitindo a perfuração da membrana e a libertação do conteúdo citosólico dos trofoblastos. Assim, o ZIKV induz piroptose através da via de sinalização TNF α – Caspase-8 – Caspase-3 – GSDME⁽⁷⁵⁾.

A inativação da gasdermina E em células infetadas pelo vírus Zika aumenta a viabilidade celular, através da diminuição da piroptose, o que leva a uma diminuição do dano provocado na placenta e a uma melhoria no prognóstico do feto. No entanto, não diminuí a replicação viral, ou seja, não produz uma ação antiviral, nem impede a transmissão do vírus da placenta para o feto⁽⁷⁵⁾.

Para além da piroptose, a resposta imunológica exacerbada contribui para a inflamação da placenta e o aumento da sua permeabilidade.

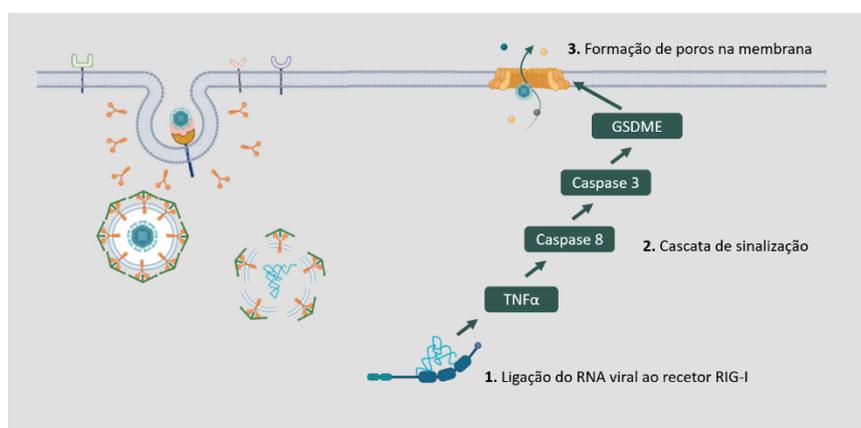


Figura 52 – Mecanismo de piroptose induzida pelo RNA viral do vírus Zika. (Adaptado de: 75)

4.2. Infeção neurológica fetal

Após a passagem da barreira placentária, e uma vez que o vírus atinge o cérebro fetal em desenvolvimento, este infeta preferencialmente as zonas ventricular e subventricular do cérebro. Sendo que a zona ventricular consiste em células neuroepiteliais e da glia radial, enquanto a zona subventricular contém células

progenitoras intermediárias. As células da glia radial dão origem a neurónios, astrócitos, endimócitos e oligodendrócitos e as células progenitoras intermédias originam neurónios, ou células da glia⁽⁷⁸⁾.

O vírus Zika induz neuropatogénese através de diversos mecanismos, particularmente piroptose, desregulação do ciclo celular e resposta imune e inflamatória⁽⁷⁸⁾.

A piroptose provou ter o papel mais relevante no desenvolvimento de anomalias neurológicas congénitas, nomeadamente na microcefalia, sendo que os processos apoptóticos no sistema neurológico do feto são semelhantes aos descritos para a infeção placentária⁽⁷⁸⁾.

Um outro mecanismo associado às anomalias congénitas, fruto da infeção protagonizada pelo ZIKV, é a desregulação do ciclo celular. O ciclo celular é interrompido nas fases G2 e M, através da fosforilação das proteínas p53 e p21, pelas proteínas do invólucro do ZIKV. Esta desregulação do ciclo celular e consequentemente do processo mitótico está, mais uma vez, associada à microcefalia⁽⁷⁸⁾.

Por fim, estes mecanismos são acompanhados por uma resposta imunológica e inflamatória intensa, com alterações da expressão genética e elevada produção de citocinas. Tal como acontece no tecido placentário, também no tecido neurológico há uma desregulação da via dos interferões⁽⁸⁰⁾. Esta desregulação é ainda acompanhada pela libertação de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-8) e quimiocinas (CCL5 e CXCL10), que modulam a integridade da barreira hematoencefálica, sendo que o seu aumento conduz a uma maior permeabilidade da mesma⁽⁷⁸⁾.

Dentro da resposta imunológica, a ativação do recetor TLR3, associado à resposta imune inata, demonstra ter um papel interessante na transcrição de genes associados ao desenvolvimento neurológico. A disrupção destes genes leva a uma diminuição do volume cerebral e às respetivas consequências neurológicas⁽⁷⁸⁾.

5. Infeção congénita pelo vírus Zika – manifestações clínicas

5.1. Alterações morfológicas do crânio

A manifestação clínica mais associada à infeção congénita pelo vírus Zika é a microcefalia, que, embora não esteja presente em todos os fetos infetados, está presente em mais de metade dos casos com anomalias congénitas, podendo ser detetada durante a gestação, ao nascimento, ou nos primeiros meses de vida^(81, 82). A microcefalia é definida por um perímetro cefálico diminuído, quando comparado com fetos da mesma idade e sexo, e pode ser considerada moderada, ou severa consoante o desvio associado ao intervalo de referência⁽⁷⁴⁾. Uma vez que, no caso do vírus Zika, a microcefalia é uma anomalia associada ao período de gestação, esta é considerada uma microcefalia primária⁽⁸³⁾ e pode ser acompanhada de outras alterações morfológicas, consistentes com uma sequência disruptiva do cérebro fetal (FBDS - fetal brain disruption sequence), tais como: suturas cranianas sobrepostas, osso occipital proeminente, depressão dos ossos frontais e parietais e pele excessiva no couro cabeludo. Estas alterações acontecem, após um crescimento normal no início da gestação, na sequência da perda de volume cerebral e consequente diminuição da pressão intracraniana e são tipicamente detetadas nos fetos, ainda durante a gestação, devido ao reduzido perímetro cefálico⁽⁵⁹⁾.

Esta redução do perímetro cefálico e consequente alteração da morfologia craniana resulta de danos neurológicos provocados pelo vírus Zika e podem mais tarde ser associadas a atrasos no desenvolvimento, perda da capacidade auditiva, dificuldades em engolir, dificuldades respiratórias e alterações na fala⁽⁸⁴⁾. Para além de que o comprometimento do neurodesenvolvimento inerente à infeção pelo vírus Zika pode associar-se a problemas noutros sistemas, como é o caso do trato urinário. Uma vez que o sistema nervoso central está envolvido no controlo do trato urinário inferior, existe uma correlação entre a gravidade dos sintomas que afetam este trato e o perímetro cefálico à nascença⁽⁸⁵⁾.

5.2. Anomalias cerebrais

A neuropatologia associada à infecção congénita pelo vírus Zika é semelhante à da infecção congénita pelo citomegalovírus, sendo a distinção na distribuição das calcificações intracranianas, que são periventriculares no caso do CMV e subcorticais no caso do ZIKV. Para além das calcificações, estão relatadas outras anomalias, nomeadamente o aumento dos espaços ventriculares e extra-axial, diminuição da espessura do córtex com padrões anormais de circunvoluções cerebrais, hipoplasia, dismorfia ou ausência do corpo caloso, mielinização diminuída e hipoplasia do cerebelo ou do vérmis cerebelar^(59, 81).

Todas estas anomalias cerebrais estão relacionadas com a morte celular induzida pela infecção pelo ZIKV, que demonstra ter como principal alvo as células progenitoras neurais, levando à diminuição da proliferação e migração dos neurónios devido à piroptose das suas células progenitoras⁽⁵⁹⁾.

Para além das anomalias cerebrais comprovadamente associadas à infecção pelo vírus Zika, torna-se relevante mencionar a possibilidade de infecção congénita pelo ZIKV estar associada ao desenvolvimento de perturbações do espectro do autismo, nomeadamente em crianças sem outras alterações associadas à Síndrome Congénita do vírus Zika⁽⁸⁶⁾.

5.3. Anomalias oculares

Também foram reportadas, em crianças com infecção pré-natal, anomalias oculares do segmento anterior, em particular, microftalmia e coloboma da íris, mas também cataratas, calcificações intraoculares, ectasia da córnea, glaucoma e outras anomalias oculares posteriores, tais como atrofia cório-retiniana, pigmentação grosseira da mácula, ou da retina e hemorragia da retina⁽⁵⁹⁾.

Para além das alterações observadas no olho, foram também observadas anomalias associadas ao nervo ótico, nomeadamente hipoplasia e escavação do nervo ótico, nistagmos e estrabismo. Assim, as anomalias oculares associadas à síndrome congénita do vírus Zika dividem-se em anomalias no segmento anterior, no segmento posterior e no nervo ótico⁽⁸⁷⁾, e estão particularmente associadas à infecção pelo ZIKV no primeiro trimestre da gravidez e a perímetros cefálicos diminuídos^(59, 71).

Tal como acontece para outros tipos de células o surgimento das anomalias oculares mencionadas está dependente da entrada do ZIKV nas células, através da ligação aos

recetores celulares de superfície, nomeadamente o AXL, o TYRO3 e DC-SIGN, que são expressos nas células progenitoras neuronais, nas células endoteliais da microvasculatura da retina, nas células da crista neural, nos pericitos da retina, nos macrófagos e nas células dendríticas⁽⁷¹⁾. No entanto, também é necessária a evasão do vírus ao sistema imunológico para que se desenvolvam estas anomalias. Assim, apesar dos recetores TLR3 e RIG-1, presentes no citosol, funcionarem como sensores de PAMPs (pattern associated molecular patterns) expressos pelos ZIKV, que vão desencadear uma resposta imunológica inata, as proteínas virais (NS1 e NS4) vão inativar a cascata de sinalização desencadeada por estes recetores e permitir que o vírus Zika continue a causar dano⁽⁷¹⁾.

5.4. Anomalias motoras

A infeção congénita pelo vírus Zika afeta o trato corticoespinal, os neurónios motores, ou as suas interações o que pode causar anomalias motoras fetais levando a movimentos fetais diminuídos e a patologias como o pé torto congénito e artrogripose múltipla congénita. Artrogripose é o termo utilizado para descrever contraturas congénitas em múltiplas articulações, que variam em tipo, lateralidade, gravidade, etc. e é uma condição que tem sido associada frequentemente à Síndrome Congénita pelo vírus Zika⁽⁵⁹⁾. Segundo Leão et al.⁽⁸²⁾ a artrogripose está presente em cerca de 10% dos fetos infetados com ZIKV, enquanto a presença de contraturas em, pelo menos, uma articulação atinge 42% dos casos⁽⁸²⁾.

Para além das contraturas, a infeção pelo vírus Zika tem sido associada a uma restrição do crescimento intrauterino, bem como a um peso e estatura diminuídos, tanto no momento do parto, como no acompanhamento dos primeiros anos de vida. Estas restrições de crescimento podem levar a atrasos no desenvolvimento motor e parecem estar associadas ao dano causado na placenta durante a gravidez⁽⁸⁸⁾.

6. Deteção e diagnóstico laboratorial do ZIKV

O diagnóstico inicial da infeção pelo vírus Zika em adultos é complicado, uma vez que esta infeção apresenta um quadro de sintomas semelhante ao de outros arbovírus como é o caso do Dengue, ou do Chikungunya, abrange a mesma área geográfica e apresenta reação cruzada na serologia para deteção destes vírus^(57, 76). No início da epidemia do ZIKV apenas laboratórios que preparavam os seu próprios reagentes tinham capacidade de detetar uma infeção pelo ZIKV. No entanto, o aumento do número de casos priorizou o alargamento da testagem e a implementação de novos métodos para esta⁽⁵⁷⁾.

Após o surto da Micronésia, a deteção do vírus Zika passou a assentar em métodos serológicos (ex: MAC-ELISA) e de amplificação de ácidos nucleicos (ex: RT-PCR), apesar das reações cruzadas com outros arbovírus, como é o caso do DENV, que tem uma homologia com o ZIKV superior a 50%^(62, 76). No entanto, o ZIKV apenas é detetável pelos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) durante um breve período correspondente à doença aguda, e nos adultos é difícil detetar esse período, tendo em atenção que 80% dos adultos são assintomáticos durante a infeção pelo ZIKV⁽⁵⁷⁾. Assim, os métodos serológicos, nomeadamente a ELISA, são os que mais contribuem para o diagnóstico da infeção pelo vírus Zika em adultos, em particular a deteção de imunoglobulinas IgM, que geralmente permanecem no soro entre 2 e 12 semanas⁽⁵⁷⁾. Após este período inicia-se a seroconversão das imunoglobulinas IgM em IgG, que são associadas à convalescença da doença, sendo que pode deixar de ser possível a deteção das imunoglobulinas IgM⁽⁷¹⁾. São ainda utilizados os testes de neutralização por redução em placas (PRNT), que são ensaios que permitem quantificar os títulos de anticorpos neutralizantes, embora a utilização desta técnica esteja restrita⁽⁸⁹⁾.

No caso da síndrome congénita pelo vírus Zika os diagnósticos diferenciais incluem as infeções causadas pelo Citomegalovírus, o vírus Herpes Simplex, o parasita da toxoplasmose, o vírus da Rubéola e a Sífilis⁽⁷¹⁾. Os primeiros passos para a deteção da infeção congénita pelo vírus Zika são a deteção de infeção na progenitora e a deteção das anomalias que descrevemos, durante as ecografias de seguimento da gravidez⁽⁵⁷⁾. No caso das mulheres grávidas, a deteção de RNA torna-se o *gold standard*, uma vez que os ácidos nucleicos são detetáveis até 14 semanas após a infeção⁽⁹⁰⁾. Assim, as mulheres grávidas que apresentem sintomatologia compatível com a infeção pelo vírus Zika devem realizar um teste de amplificação de ácidos nucleicos em duas amostras (soro e urina) nas 12 semanas após a possível infeção⁽⁸⁹⁾.

Durante a gestação, mesmo após a confirmação da infeção na gestante, não está recomendada a realização de testes diagnósticos para os fetos, exceto quando é realizada uma amniocentese, como parte dos cuidados de saúde. Neste caso, deve realizar-se a deteção de ácidos nucleicos no líquido amniótico⁽⁸⁹⁾.

Após o nascimento de um bebé cuja progenitora teve, durante a gravidez, uma infeção pelo vírus Zika confirmada, ou a suspeita da mesma, deve ser feita a colheita de sangue, soro, tecido placentário, parte do cordão umbilical e líquido cefalorraquidiano. Nestas amostras será feita a deteção de ácidos nucleicos (RT-PCR) e de IgM, bem como o estudo histopatológico⁽⁶⁷⁾.

Com a necessidade generalizada de realizar testes serológicos para a deteção do ZIKV, surgiram os kits comerciais que utilizam a técnica de ELISA. Estes testes usam como antigénio a proteína viral NS1, permitindo detetar as imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) presentes no soro, que foram produzidas pelo hospedeiro contra o vírus. Estes kits comerciais apresentam uma especificidade superior à da técnica de MAC-ELISA, no entanto tem uma sensibilidade inferior⁽⁷⁴⁾.

7. Sequelas e prognóstico

Como vimos anteriormente os estudos apontam para que fetos infectados pelo vírus Zika sofram atrasos no desenvolvimento neuropsicomotor e no crescimento, sendo que estes atrasos estão maioritariamente associados à existência de microcefalia, tanto congénita, como pós-natal. A falta de desenvolvimento de capacidades neurológicas e motoras está claramente associada à extensão do dano no sistema nervoso central e consequentemente à gravidade da microcefalia, sendo que muitas das crianças não são capazes de realizar funções básicas, como sentar, ou sustentar a cabeça, e apresentam atrasos cognitivos e de linguagem. Para além do atraso neuropsicomotor, há evidência de desenvolvimento de quadros epilépticos associados ao dano neurológico provocado pelo ZIKV, que nos casos mais graves não conseguem ser controlados farmacologicamente^(60, 91, 92).

No caso de filhos de mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gestação, mas que não desenvolveram anomalias congénitas, nem testaram positivo ao vírus, quer durante a gestação, quer após o parto, a possível exposição ao vírus Zika não se mostra impactante no desenvolvimento neurológico. Sendo que estes bebés apresentam um risco de desenvolver problemas neurológicos semelhante ao dos bebés cujas mães não tiveram qualquer contacto com o ZIKV⁽⁹³⁾.

Assim, a confirmação laboratorial da infeção pelo ZIKV, bem como a deteção de anomalias durante a gravidez são indispensáveis para a caracterização do risco associado ao prognóstico dos fetos cujas mães tenham sido infectadas. A deteção laboratorial de anticorpos contra o vírus Zika no recém nascido, mesmo sem a deteção de anomalias durante a gravidez, agrava o prognóstico da criança. Sendo que a presença de alterações morfológicas do crânio, nomeadamente microcefalia, que como já vimos tem repercussões no desenvolvimento neuropsicomotor, é o pior indicador para o prognóstico⁽⁶⁰⁾.

Para além dos atrasos de desenvolvimento, a infeção congénita pelo ZIKV está associada a um aumento do risco de mortalidade nos primeiros 3 anos de vida. Este risco é cerca de duas vezes superior ao das crianças que não foram expostas ao vírus e aumenta quando há diminuição do perímetro cefálico, bem como quando são detetadas alterações morfológicas do crânio nos exames de imagem realizados durante a gravidez⁽⁹⁴⁾. Apesar do atual conhecimento sobre o prognóstico no caso dos fetos que são afetados pela Síndrome Congénita pelo vírus Zika e de no nosso país a interrupção voluntária da gravidez ser uma realidade normalizada, em alguns dos países mais

afetados pelo ZIKV a interrupção médica da gravidez é ilegal, o que invalida esta opção para as mulheres grávidas, mesmo que tenham sido detetadas malformações no feto durante o seguimento pré-natal, que indiquem um mau prognóstico⁽⁶⁹⁾.

8. Tratamento e Prevenção

Desde 2013 e até ao presente momento, a melhor forma de nos protegermos da infeção pelo vírus Zika é tomando medidas preventivas, uma vez que ainda não existem métodos de prevenção farmacológicos. Tendo em conta que a principal preocupação com o vírus Zika se prende com a síndrome congénita e com as sequelas nos recém nascidos que contraem a infeção durante a gravidez, estas medidas tornam-se especialmente relevantes para as mulheres grávidas que tenham contacto com as áreas endémicas. Assim, é necessário prevenir a picada de mosquitos, utilizando repelente, roupas compridas e redes mosquiteiras, mas também ter cuidados redobrados com a vida sexual, evitando contacto sexual com parceiros possivelmente infetados e utilizando de forma sistemática preservativos⁽⁹⁵⁾.

Os protocolos de tratamento para a infeção para o vírus Zika, neste momento, estão voltados para o tratamento da sintomatologia e para a reabilitação, não havendo fármacos disponíveis para a prevenção da infeção pelo ZIKV. No entanto, há fármacos aprovados para outras patologias a serem testados para a prevenção e tratamento da infeção pelo ZIKV, como é o caso do sofosbuvir e do favipiravir, utilizados no tratamento da hepatite C, bem como da cloroquina, um fármaco antimalárico, que demonstrou diminuir a transmissão vertical e os danos provocados aos fetos, quando administrado em ratos⁽⁸²⁾.

8.1. Vacinas

Quanto à possibilidade de administração de vacinas para prevenir a infeção, ou diminuir as sequelas associadas à infeção pelo vírus Zika, estão em desenvolvimento várias vacinas, que utilizam diferentes métodos (ex: DNA, mRNA, vírus inativado, etc.), algumas já em fase de ensaios clínicos⁽⁹⁶⁾.

As vacinas de DNA são geradas ao converter um antígeno do vírus num plasmídeo de DNA, que ao ser transcrito em mRNA e traduzido no referido antígeno, vai ativar o sistema imunológico, levando à produção de anticorpos contra estes antígenos, que vão combater o vírus aquando de uma possível infeção. São vacinas seguras, estáveis e que acarretam baixos custos na sua produção. Neste momento, existem 4 vacinas deste tipo em desenvolvimento, três na primeira fase e uma na segunda fase dos ensaios clínicos⁽⁹⁶⁾.

As vacinas de mRNA funcionam de forma semelhante às de DNA, sendo constituídas por uma sequência de RNA mensageiro que codifica uma proteína viral que após tradução, vai induzir o sistema imunológico. Este tipo de vacina é amplamente utilizado, uma vez que é de simples e rápida produção, tendo-se tornado uma alternativa promissora às abordagens mais convencionais. Existem neste momento duas vacinas de mRNA na primeira fase dos ensaios clínicos e uma na segunda fase, a serem desenvolvidas pelo laboratório ModernaTX, Inc.⁽⁹⁶⁾.

Existem ainda vacinas que utilizam o vírus em si, de diferentes formas, para ativar o sistema imunológico. Uma das vacinas a serem desenvolvidas utiliza um vetor viral para expressar proteínas do invólucro do vírus Zika e induzir o sistema imunológico. Três das vacinas utilizam o vírus Zika inativado e uma utilizada o vírus vivo atenuado. Estas abordagens podem ser menos apropriadas para indivíduos com o sistema imunológico comprometido e requerem geralmente instalações mais especializadas para a sua produção⁽⁹⁶⁾.

Tabela 7 - Tipos de vacinas contra o vírus Zika, em diferentes fases dos ensaios clínicos

Tipo de vacina	Identificador ClinicalTrials.Gov	Fase dos ensaios clínicos	Desenvolvedores
DNA	NCT02840487 ⁽⁹⁷⁾	Fase I	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)
	NCT02996461 ⁽⁹⁷⁾	Fase I	NIAID
	NCT02809443 ⁽⁹⁸⁾	Fase I	GeneOne Life Science, Inc. Inovio Pharmaceuticals
	NCT03110770 ⁽⁹⁷⁾	Fase II	NIAID
mRNA	NCT04064905 ⁽⁹⁹⁾	Fase I	ModernaTX, Inc.
	NCT03014089 ⁽⁹⁹⁾	Fase I	ModernaTX, Inc.
	NCT04917861 ⁽¹⁰⁰⁾	Fase II	ModernaTX, Inc.
Vetor viral	NCT04015648 ⁽¹⁰¹⁾	Fase I	University of Oxford
Vírus inativado purificado	NCT02937233 ⁽¹⁰²⁾	Fase I	NIAID
	NCT02963909 ⁽¹⁰²⁾	Fase I	NIAID
	NCT03008122 ⁽¹⁰²⁾	Fase I	NIAID
Vírus vivo atenuado	NCT03611946 ⁽¹⁰³⁾	Fase I	NIAID

Apesar destas dificuldades, uma vacina constituída pelo vírus Zika inativado provou induzir a neutralização do vírus e conferir imunidade por pelo menos um ano, em animais. Os avanços para a primeira fase dos ensaios clínicos provou que a vacina é segura, produz resposta imunitária e induz células B protetoras, tanto contra o ZIKV, como contra o DENV⁽¹⁰⁴⁾.

Foi também testado recentemente o efeito da vacina contra o vírus da Febra Amarela (YFV), na infeção pelo vírus Zika em ratinhos. Esta vacina induziu imunidade,

diminuiu a taxa de mortalidade e reduziu a carga viral presente no cérebro. No entanto, a proteção induzida pela vacina é de curta duração, uma vez que não leva à produção de anticorpos específicos contra o vírus Zika. Assim, a proteção contra o ZIKV como efeito colateral da administração da vacina contra o YFV é interessante, porém não resolve a necessidade de evitar a infecção do vírus Zika a longo prazo⁽¹⁰⁵⁾.

Assim, as vacinas estão no centro das preocupações atuais para prevenir a infecção pelo vírus Zika e têm tido uma ótima evolução nos últimos anos, porém ainda não existe nenhuma vacina na última fase dos ensaios clínicos, ou seja, perto de estar disponível.

9. Falhas de conhecimento e pesquisas futuras

Apesar de todo o conhecimento adquirido nos últimos anos acerca do vírus Zika e da síndrome congênita a ele associada, existem muitas questões que permanecem por responder. Sendo que muitas delas se encontram a ser alvo de investigação pela comunidade científica.

Quais os fatores que mais influenciam a transmissão vertical entre uma progenitora infectada e o seu feto? Quais as diferenças genómicas entre as estirpes/linhagens que mais influenciam a patogenicidade do vírus? Quando conseguiremos implementar uma vacina eficaz na prevenção da infeção pelo ZIKV? Será que a incidência da Síndrome Congénita pelo vírus Zika na população é influenciada por fatores socioeconómicos? É possível que haja desenvolvimento de problemas neurológicos indetetáveis em idades precoces, mas que se venham a manifestar mais tarde, por exemplo, na adolescência, ou na vida adulta?

Muitas são as questões que ainda surgem sobre o vírus Zika e para as quais não encontrei resposta na literatura atualmente publicada. No entanto, esta temática está muito presente na comunidade científica e são vários os grupos a nível mundial que dedicam os seus esforços a tentar esclarecer estas questões, havendo novas informações a serem divulgadas com muita regularidade.

10. Materiais e métodos

A revisão sistemática foi realizada com base no protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews). Tendo sido realizada uma pesquisa, na base de dados PubMed, de artigos científicos, nas línguas portuguesa e inglesa, publicados a partir do ano de 2016, recorrendo às palavras-chave: “*Zika Virus*”, “*Microcephaly*” e “*Congenital Zika Syndrome*”. Esta pesquisa originou 758 resultados, sendo que foram aplicados os critérios de exclusão, nomeadamente, a eliminação de artigos em duplicado, que não contivessem informação sobre a Síndrome Congénita do *vírus Zika*, que se baseassem em estudos com populações reduzidas e pouco ilustrativas, ou que contivessem informação redundante face à já descrita em artigos lidos previamente. Após a aplicação destes critérios de exclusão integraram a bibliografia final 47 artigos científicos, complementados por 4 páginas web da Organização Mundial de Saúde (WHO) e do Centro de Prevenção e Controlo da Doença (CDC).

11. Conclusão

O vírus Zika, que durante muitos anos se pensou ser inofensivo para os humanos, tornou-se foco da atenção global em 2015, quando se descobriu a sua associação com as malformações congénitas.⁽⁵⁵⁾ Após vários anos a ser estudado, as principais características do vírus, bem como os principais mecanismos patogénicos a ele associados encontram-se elucidados e tornaram-se o principal alvo desta revisão sistemática. No entanto, apesar da quantidade de informação que surgiu acerca do vírus nos últimos anos, é necessária a continuação dos estudos e ensaios no sentido de tornar disponíveis à população mais afetada métodos para a prevenção da infeção pelo ZIKV, nomeadamente vacinas e fármacos, sendo que as vacinas se mostraram o caminho mais promissor. Concluiu-se também que é essencial o contínuo seguimento dos fetos afetados, para esclarecer as possíveis sequelas que os podem vir a afetar na adolescência e na idade adulta, dado que ainda não foi possível o levantamento desta informação uma vez que os primeiros fetos a serem seguidos nasceram entre 2015 e 2016, tendo atualmente 7 e 8 anos.

12. Referências bibliográficas

Relatório de Estágio

1. Manual do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Braga, (2019).
2. SIEMENS. Rapidlab 1200 Systems Operator's Guide2010.
3. SIEMENS. Solução Atellica de Analisadores de Imunoensaio & Química Clínica 2022 [
4. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502.
5. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, (2011).
6. Daniel L. Swagerty J. Lactose Intolerance2002.
7. Abbas AK. Basic Immunology. th, editor2016.
8. A.MENARINI. Zenit UP 2022 [Available from: <https://www.menarini diag.pt/en-us/Home/Professional-Diagnostics/Autoimmunity/Zenit-UP>.
9. A.MENARINI. Zenit G-Sight 2022 [Available from: <https://www.menarini diag.es/en-us/home/professional-diagnostics/autoimmunity/zenit-g-sight>.
10. A.MENARINI. Zenit AmiDot 2022 [Available from: <https://www.menarini diagnostics.com/en-us/Home/Professional-Diagnostics/Autoimmunity/Zenit-AMiDot/Features>.
11. Manual de Procedimentos - Imunologia, (2022).
12. Motic. BA410E Binocular Sextuple 50W 2022 [Available from: <https://moticeurope.com/en/ba410e-binocular-sextuple-50w.html>.
13. A.MENARINI. Zenit RA 2022 [Available from: <https://www.menarini diagnostics.com/en-us/Home/Professional-Diagnostics/Autoimmunity/Zenit-RA/Features>.
14. Technologies D. Dynex DSX 2022 [Available from: <https://www.dynex technologies.com/our-products/dsx/>.
15. Fujirebio. Auto-LIA 2022 [Available from: <https://www.fujirebio.com/en/products-solutions/autolia-48>.
16. DiaSorin. LIAISON 2022 [Available from: <https://www.diasorin.com/en/immunodiagnostic-solutions/systems/clia-systems/liaisonr>.
17. Coulter B. Cytomics FC 500 Quick Reference 2005 [Available from: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=FC%20500%20Quick%20Reference%20>.
18. Buhlmann. Quantum Blue Reader 2nd Generation 2022 [Available from: <https://www.buhlmannlabs.ch/products-solutions/gastroenterology/quantum-blue/quantum-blue-reader-2nd-generation/>.
19. SIEMENS. Sysmex CS-2500 System 2022 [Available from: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/sysmex-cs-2500-system>.
20. Sysmex. Especificações Série XN 2012 [Available from: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Especificaca%C3%A7%C3%B5es-Portugu%C3%AAs.pdf>.
21. Sysmex. Tecnologia e Parâmetros Clínicos Avançados 2012 [Available from: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Tecnologia-Portugu%C3%AAs.pdf>.
22. Sysmex. Eritrócitos nucleados (NRBC) 2022 [Available from: <https://www.sysmex.es/es-pt/academia/knowledge-centre/parametros-sysmex/nucleated-red-blood-cells-nrbc.html>.
23. Sysmex. Reticulócitos e seus parâmetros 2007 [Available from: <http://www.sysmexwebinars.com/wp-content/uploads/2017/09/325652555.pdf>.
24. DIESSE. VES-MATIC 30 2022 [Available from: <https://www.diesse.it/en/products/ves-matic-30/>.
25. ARKRAY. Analisador automático de glicohemoglobina ADAMS A1c HA-8180T para B-talassémia 2022 [Available from: <https://www.arkray.eu/pt/portuguese/products/diabetes/habalc/ha-8180t.html>.
26. Prevention CfDCa. All about your A1c 2022 [Available from: <https://www.cdc.gov/diabetes/managing/managing-blood-sugar/a1c.html>.
27. ThermoShandon. Cytospin3 Cell Preparation System Operator Guide 2022 [Available from: <https://www.marshallscientific.com/v/vspfiles/files/manuals/shandon-cytospin-3-operator-guide.pdf>.
28. Scientific T. KingFisher Flex System 2022 [Available from: https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/kingfisher-systems/models/kingfisher-flex.html?qlid=CjwKCAiAheacBhB8EiwAltVO238mF-89bp3QSnS2nNbwIhBeMxIOP9dSjVDx-cw74SNvpOP3vGZSQRoC3rQQAvD BwE&ef_id=CjwKCAiAheacBhB8EiwAltVO238mF-89bp3QSnS2nNbwIhBeMxIOP9dSjVDx-cw74SNvpOP3vGZSQRoC3rQQAvD BwE:G:s&s_kwcid=AL13652!3!641075339703!e!!g!!king%20fisher%20flex!159192654841135239510631&cid=bid_sap_kgf_r01_co_cp1362_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con.

29. Roche. MagNA Pure 24 System 2022 [Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/magna-pure-24-ins-6065.html#productInfo>.
30. Roche. LightCycler 480 Instrument II 2022 [Available from: <https://sequencing.roche.com/us/en/products/group/lightcycler-480-ii.html>.
31. Scientific T. QuantStudio 5 Real-Time PCR System for Human Identification, 96-well, 0,2 mL, desktop 2022 [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A34322>.
32. Scientific T. Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler 2022 [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4375305?SID=srch-srp-4375305>.
33. Scientific T. SeqStudio Genetic Analyzer System with SmartStart 2022 [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A35644>.
34. Roche. Cobas 4800 System 2022 [Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas-4800-system-sys-139.html>.
35. Roche. LightCycler 480 Probes Master 2022 [Available from: <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/lightcycler-480-probes-master-358111.html>.
36. Roche. LightCycler 2.0 System 2022 [Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/lightcycler-2-0-ins-409.html#productSpecs>.
37. Roche. LightCycler FastStart DNA Master HybProbe 2022 [Available from: <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/lightcycler-faststart-dna-master-hybprobe-355132.html>.
38. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3194-9.
39. Bollhalder M, Mura C, Landt O, Maly FE. LightCycler PCR assay for simultaneous detection of the H63D and S65C mutations in the HFE hemochromatosis gene based on opposite melting temperature shifts. Clin Chem. 1999;45(12):2275-8.
40. Bruker. MALDI Biotyper sirius IVD System 2022 [cited 2023. Available from: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-ivd-ce/maldi-biotyper-sirius-ivd.html>.
41. Biomérieux. How does VITEK 2 Generate MIC Values? 2017 [Available from: <https://www.biomerieux-microbio.com/how-does-vitek-2-generate-mic-values/>.
42. Testing ECoAS. EUCAST Disk Difussion Test Methodology 2023 [Available from: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology.
43. Testing ECoAS. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 2023 [Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf.
44. Testing ECoAS. MIC determination of non-fastidious and fastidious organisms 2022 [Available from: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination.
45. MariPOC. Summary of mariPOC test performance 2020 [Available from: <https://www.arcDia.com/maripoc/performance/>.
46. mariPOC. mariPOC Respi+ test for COVID-19 and influenza-like illnesses 2020 [Available from: <https://www.arcDia.com/maripoc/tests/respi-tests/>.
47. Cepheid. GeneXpert Systems 2023 [Available from: https://www.cepheid.com/en_US/systems/GeneXpert-Family-of-Systems/GeneXpert-System.
48. BD. BD BACTET MGIT 960 e 320 - Sistema Completo para Micobactérias 2023 [Available from: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/microbiology-testing/bactec-mgit-960-and-320>.
49. Bruker. GenoType NTM-DR VER 1.0 2020 [Available from: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-ntm-dr.html>.
50. Abbott. Biline TB Ag MPT64 - Test to discriminate between M. tuberculosis complex and MOTT(NTM) 2023 [Available from: <https://www.globalpointofcare.abbott/en/product-details/biline-tb-ag-mpt64-rapid.html>.
51. NEQAS U. UK NEQAS Internacional Quality Expertise 2022 [Available from: <https://ukneqas.org.uk/>.
52. Randox. RIQAS External Quality Assessment 2022 [Available from: <https://www.randox.com/riqas-external-quality-assessment/>.
53. Association ECT. ECTA Quality Control 2022 [Available from: <https://www.ecta.com/responsible-care/>.
54. LABQUALITY. SQAS - Safety and Quality Assessment for Sustainability 2022 [Available from: <https://www.sqas.org/>.

Dissertação

55. Freitas DA, Souza-Santos R, Carvalho LMA, Barros WB, Neves LM, Brasil P, et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLoS One*. 2020;15(12):e0242367.
56. Ze-Ze L, Prata MB, Teixeira T, Marques N, Mondragao A, Fernandes R, et al. Zika virus infections imported from Brazil to Portugal, 2015. *IDCases*. 2016;4:46-9.
57. Landry ML, St George K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(1):60-7.
58. Masmajan S, Musso D, Vouga M, Pomar L, Dashraath P, Stojanov M, et al. Zika Virus. *Pathogens*. 2020;9(11).
59. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, Fonseca EB, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr*. 2017;171(3):288-95.
60. Hcini N, Kugbe Y, Rafalimanana ZHL, Lambert V, Mathieu M, Carles G, et al. Association between confirmed congenital Zika infection at birth and outcomes up to 3 years of life. *Nat Commun*. 2021;12(1):3270.
61. Marban-Castro E, Gonce A, Fumado V, Romero-Acevedo L, Bardaji A. Zika virus infection in pregnant women and their children: A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021;265:162-8.
62. Estevez-Herrera J, Perez-Yanes S, Cabrera-Rodriguez R, Marquez-Arce D, Trujillo-Gonzalez R, Machado JD, et al. Zika Virus Pathogenesis: A Battle for Immune Evasion. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(3).
63. Barbeito-Andres J, Schuler-Faccini L, Garcez PP. Why is congenital Zika syndrome asymmetrically distributed among human populations? *PLoS Biol*. 2018;16(8):e2006592.
64. Fanunza E, Carletti F, Quartu M, Grandi N, Ermellino L, Milia J, et al. Zika virus NS2A inhibits interferon signaling by degradation of STAT1 and STAT2. *Virulence*. 2021;12(1):1580-96.
65. Ribeiro BG, Werner H, Lopes F, Hygino da Cruz LC, Jr., Fazecas TM, Daltro PAN, et al. Central Nervous System Effects of Intrauterine Zika Virus Infection: A Pictorial Review. *Radiographics*. 2017;37(6):1840-50.
66. Platt DJ, Miner JJ. Consequences of congenital Zika virus infection. *Curr Opin Virol*. 2017;27:1-7.
67. WHO. Zika Epidemiology Update February 2022 Portal da Organização Mundial de Saúde 2022 [Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022>].
68. WHO. Countries and territories with current or previous Zika virus transmission February 2022 Portal da Organização Mundial de Saúde: World Health Organization; 2022 [Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/emergencies/zika/map-of-countries-with-zika-transmission-feb2022.pdf?sfvrsn=802a352a_5].
69. Marban-Castro E, Villen-Gonzalvo A, Enguita-Fernandez C, Marin-Cos A, Menendez C, Maixenchs M, et al. Uncertainties, Fear and Stigma: Perceptions of Zika Virus among Pregnant Women in Spain. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18).
70. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):487-524.
71. Labib BA, Chigbu DI. Pathogenesis and Manifestations of Zika Virus-Associated Ocular Diseases. *Trop Med Infect Dis*. 2022;7(6).
72. Martins MM, Medronho RA, Cunha A. Zika virus in Brazil and worldwide: a narrative review. *Paediatr Int Child Health*. 2021;41(1):28-35.
73. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet*. 2017;390(10107):2099-109.
74. Vue D, Tang Q. Zika Virus Overview: Transmission, Origin, Pathogenesis, Animal Model and Diagnosis. *Zoonoses (Burlingt)*. 2021;1(1).
75. Zhao Z, Li Q, Ashraf U, Yang M, Zhu W, Gu J, et al. Zika virus causes placental pyroptosis and associated adverse fetal outcomes by activating GSDME. *Elife*. 2022;11.
76. Hamel R, Liegeois F, Wichit S, Pompon J, Diop F, Talignani L, et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect*. 2016;18(7-8):441-9.
77. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):591-6.
78. Komarasamy TV, Adnan NAA, James W, Balasubramaniam V. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Front Immunol*. 2022;13:773191.
79. Hastings AK, Hastings K, Uraki R, Hwang J, Gaitsch H, Dhaliwal K, et al. Loss of the TAM Receptor Axl Ameliorates Severe Zika Virus Pathogenesis and Reduces Apoptosis in Microglia. *iScience*. 2019;13:339-50.
80. Azamor T, Cunha DP, da Silva AMV, Bezerra OCL, Ribeiro-Alves M, Calvo TL, et al. Congenital Zika Syndrome Is Associated With Interferon Alfa Receptor 1. *Front Immunol*. 2021;12:764746.
81. Liang B, Guida JP, Costa Do Nascimento ML, Mysorekar IU. Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome. *Virulence*. 2019;10(1):768-75.
82. VHP L, Aragao MM, Pinho RS, Hazin AN, Paciorkowski AR, Penalva de Oliveira AC, et al. Congenital Zika Virus Infection: a Review with Emphasis on the Spectrum of Brain Abnormalities. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2020;20(11):49.

83. Malone RW, Homan J, Callahan MV, Glasspool-Malone J, Damodaran L, Schneider Ade B, et al. Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004530.
84. Cristina da Silva Rosa B, Hernandez Alves Ribeiro Cesar CP, Paranhos LR, Guedes-Granzotti RB, Lewis DR. Speech-language disorders in children with congenital Zika virus syndrome: A systematic review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2020;138:110309.
85. Antoniou E, Orovou E, Andronikidi PE, Orovos C, Rigas N, Palaska E, et al. Congenital Zika Infection and the Risk of Neurodevelopmental, Neurological, and Urinary Track Disorders in Early Childhood. A Systematic Review. *Viruses*. 2021;13(8).
86. Santi L, Riesgo RS, Quincozes-Santos A, Schuler-Faccini L, Tureta EF, Rosa RL, et al. Zika Virus Infection Associated with Autism Spectrum Disorder: A Case Report. *Neuroimmunomodulation*. 2021;28(4):229-32.
87. Robinson N, Mayorquin Galvan EE, Zavala Trujillo IG, Zavala-Cerna MG. Congenital Zika syndrome: Pitfalls in the placental barrier. *Rev Med Virol*. 2018;28(5):e1985.
88. Aguiar EB, Pone SM, Gomes Junior S, Soares FVM, Zin AA, Vasconcelos ZFM, et al. Anthropometric Parameters of Children with Congenital Zika Virus Exposure in the First Three Years of Life. *Viruses*. 2022;14(5).
89. (NCEZID) NCFEaZID. Zika and Dengue Testing Guidance 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/testing-guidance.html>].
90. Peters R, Stevenson M. Zika virus diagnosis: challenges and solutions. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(2):142-6.
91. Quilliao ME, Venancio FA, Mareto LK, Metzker SA, Nascimento AID, Vitorelli-Venancio DC, et al. Neurological Development, Epilepsy, and the Pharmacotherapy Approach in Children with Congenital Zika Syndrome: Results from a Two-Year Follow-up Study. *Viruses*. 2020;12(10).
92. Marban-Castro E, Gonce A, Fumado V, Martinez MJ, Lopez M, Garcia-Otero L, et al. Zika virus infection in pregnant travellers and impact on childhood neurodevelopment in the first two years of life: A prospective observational study. *Travel Med Infect Dis*. 2021;40:101985.
93. Grant R, Flechelles O, Tressieres B, Dialo M, Elenga N, Mediamolle N, et al. In utero Zika virus exposure and neurodevelopment at 24 months in toddlers normocephalic at birth: a cohort study. *BMC Med*. 2021;19(1):12.
94. Paixao ES, Rodrigues LC, Costa M, de Carvalho-Sauer RCO, Oliveira WK, Cardim LL, et al. Population-based surveillance for congenital Zika virus syndrome: a latent class analysis of recorded cases from 2015-2018. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2022;22(1):530.
95. (NCEZID) NCFEaZID. Protect Yourself & Others - Zika Transmission: Center for Disease Control and Prevention (CDC); 2020 [Available from: <https://www.cdc.gov/zika/prevention/protect-yourself-and-others.html>].
96. Wang Y, Ling L, Zhang Z, Marin-Lopez A. Current Advances in Zika Vaccine Development. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(11).
97. Gaudinski MR, Houser KV, Morabito KM, Hu Z, Yamshchikov G, Rothwell RS, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet*. 2018;391(10120):552-62.
98. Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, et al. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. *N Engl J Med*. 2021;385(12):e35.
99. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(11):817-38.
100. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(4):261-79.
101. Lopez-Camacho C, Abbink P, Larocca RA, Dejnirattisai W, Boyd M, Badamchi-Zadeh A, et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. *Nat Commun*. 2018;9(1):2441.
102. Salisch NC, Stephenson KE, Williams K, Cox F, van der Fits L, Heerwegh D, et al. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase 1 Study of Ad26.ZIKV.001, an Ad26-Vectored Anti-Zika Virus Vaccine. *Ann Intern Med*. 2021;174(5):585-94.
103. Chin WX, Lee RCH, Kaur P, Lew TS, Yogarajah T, Kong HY, et al. A single-dose live attenuated chimeric vaccine candidate against Zika virus. *NPJ Vaccines*. 2021;6(1):20.
104. Kim IJ, Lanthier PA, Clark MJ, De La Barrera RA, Tighe MP, Szaba FM, et al. Efficacy of an inactivated Zika vaccine against virus infection during pregnancy in mice and marmosets. *NPJ Vaccines*. 2022;7(1):9.
105. Vicente Santos AC, Guedes-da-Silva FH, Dumard CH, Ferreira VNS, da Costa IPS, Machado RA, et al. Yellow fever vaccine protects mice against Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(11):e0009907.