



Solange Isabel Silva Craveiro

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Solange Isabel Silva Craveiro

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais a oportunidade que me proporcionaram. Sem o seu apoio, educação e valores a realização deste Mestrado não teria sido possível. Aos restantes familiares e amigos que sempre estiveram presentes, agradeço todo o apoio e paciência. Aos meus colegas de Mestrado agradeço pela troca de conhecimento, partilha de experiências e momentos de lazer ao longo destes dois anos.

Agradeço também a todos os Professores que, durante os dois anos de Mestrado, me transmitiram grande parte do conhecimento que hoje possuo. Dou especial ênfase à Professora Doutora Leonor Almeida, coordenadora do Mestrado, e à Professora Doutora Teresa Dinis, minha orientadora interna, por todo o apoio e pelos muitos esclarecimentos prestados acerca deste relatório.

Ao Dr. Frederico Valido, diretor do Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra e meu orientador externo, por me ter permitido a realização deste Estágio no seu serviço e pela total disponibilidade para ajudar sempre que foi necessário, um especial obrigado.

Guardo um agradecimento especial para os meus orientadores em cada um dos setores do SPC, por tudo o que me ensinaram, pela paciência que tiveram para as minhas falhas e pela total disponibilidade que sempre demonstraram para esclarecer até as questões menos inteligentes. À Dr.<sup>a</sup> Ana Catarina Fonseca, ao Dr. Nuno Cunha e especialmente à Dr.<sup>a</sup> Paula Gama e ao Dr. Jorge Reis.

Agradeço ainda a todos os profissionais com quem tive oportunidade de trabalhar no SPC, por tudo o que me ensinaram. Todos me marcaram de alguma forma, pelo conhecimento que me transmitiram, pelas lições que guardarei para a vida ou por ambas as coisas. Obrigada por tudo o que me ensinaram, pelo apoio que me deram em diversos momentos e por me terem acolhido nos vossos serviços como se fosse uma de vós. Alguns de vós tiveram um significado especial e, por isso, merecem um agradecimento especial.



# Índice

Introdução.....	1
1. Caracterização do Laboratório de Estágio.....	3
2. Atividades Desenvolvidas.....	5
2.1. Hematologia.....	5
Hemograma.....	5
Contagem de Reticulócitos.....	8
Esfregaço de Sangue Periférico (SP).....	9
Velocidade de Sedimentação (VS).....	12
Provas de Hemostase.....	12
Medulograma.....	17
Citometria de Fluxo.....	18
Detecção do gene BCR-ABL.....	19
2.2. Bioquímica Clínica.....	20
2.3. Imunologia/Hormonologia.....	21
Técnicas Manuais.....	22
2.4. Microbiologia.....	23
Sangue (Hemocultura).....	23
Urina.....	28
Secreções Respiratórias.....	31
Exsudatos Purulentos e Outros Líquidos.....	33
Gânglios e Biópsias.....	34
Pontas de Cateter.....	35
Fezes.....	35
Exame Micológico para pesquisa de Dermatófitos.....	38
Identificação de Microrganismos e TSA.....	39
2.5. Controlo de Qualidade.....	45
Caso Clínico – Mieloma Múltiplo.....	49
Discussão do Caso Clínico.....	51
Conclusão.....	55
Bibliografia.....	57

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Histograma tridimensional da distribuição populacional dos leucócitos. ....	7
<b>Figura 2:</b> Modo de preparação de um esfregaço de SP. ....	9
<b>Figura 3:</b> Células sanguíneas de um indivíduo saudável. Observação ao microscópio ótico com a objetiva de 50x. ....	11
<b>Figura 4:</b> Poiquilocitose: células em alvo. ....	11
<b>Figura 5:</b> Poiquilocitose: células crenadas. ....	11
<b>Figura 6:</b> Presença de eritroblastos no SP. ....	11
<b>Figura 7:</b> Neutrófilos com granulação citotóxica. ....	11
<b>Figura 8:</b> Presença de blastos no SP. ....	11
<b>Figura 9:</b> Linfócitos ativados. ....	11
<b>Figura 10:</b> Cascata de coagulação. ....	13
<b>Figura 11:</b> Hematopoiese. ....	18
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática da amplificação de DNA por reação de polimerização em cadeia. ....	19
<b>Figura 13:</b> Constituição da parede celular de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. ....	25
<b>Figura 14:</b> Esquema da técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido. ....	26
<b>Figura 15:</b> Constituição da parede celular e membrana externa dos bacilos ácido-álcool resistentes. ....	27
<b>Figura 16:</b> Esquema da técnica de sementeira de urina. ....	29
<b>Figura 17:</b> Tira <i>Combur<sup>®</sup> 10 Test</i> . ....	30
<b>Figura 18:</b> Estruturas frequentemente observadas no sedimento urinário. Observação ao microscópio ótico com a objetiva de 40x. ....	31
<b>Figura 19:</b> Esquema da cassete utilizada na pesquisa da Glutamato Desidrogenase específica de <i>Clostridium difficile</i> . ....	36
<b>Figura 20:</b> Esquema da técnica de sementeira de amostras de LCR. ....	38
<b>Figura 21:</b> Diferentes tipos de hemólise. ....	40
<b>Figura 22:</b> Microrganismos frequentemente isolados de amostras biológicas. ....	44
<b>Figura 23:</b> Esfregaço de sangue periférico com “rouleaux”. ....	49
<b>Figura 24:</b> Resultado da eletroforese das proteínas do soro. ....	50

# Índice de Tabelas

<b>Tabela I:</b> Equipamentos existentes nos diversos setores do SPC do IPO de Coimbra e respetiva utilização.....	4
<b>Tabela II:</b> Outros parâmetros abrangidos pelo hemograma. ....	7-8
<b>Tabela III:</b> Alterações no hemograma mais frequentes e causas mais comuns no SPC.....	9
<b>Tabela IV:</b> Aspetos mais importantes a considerar num esfregaço de SP. ....	10
<b>Tabela V:</b> Alterações frequentemente encontradas em esfregaços de SP no SPC.....	11
<b>Tabela VI:</b> Parâmetros analisados no setor da Bioquímica Clínica e método utilizado, discriminados por equipamento.....	20
<b>Tabela VII:</b> Parâmetros analisados de forma automática na Imunologia/Hormonologia, por equipamento e método utilizados. ....	21
<b>Tabela VIII:</b> Técnicas manuais efetuadas no setor da Imunologia/Hormonologia e respetivo método. ....	22
<b>Tabela IX:</b> Técnica de coloração de Gram.....	24
<b>Tabela X:</b> Técnica de coloração de Kinyoun. ....	27
<b>Tabela XI:</b> Critérios de Murray-Washington para a avaliação da qualidade de amostras de expectoração.....	31
<b>Tabela XII:</b> Densidade das suspensões preparadas para identificação de microrganismos e volume necessário para o TSA, em função da carta utilizada. ....	43
<b>Tabela XIII:</b> Número de níveis de materiais de controlo de qualidade interno utilizados nos diferentes parâmetros. ....	45
<b>Tabela XIV:</b> Parâmetros determinados no setor da Hematologia para a paciente em estudo, de interesse para o diagnóstico/monitorização de Mieloma Múltiplo.....	48
<b>Tabela XV:</b> Parâmetros determinados no setor da Bioquímica Clínica para a paciente em estudo, de interesse para o diagnóstico/monitorização de Mieloma Múltiplo.....	49
<b>Tabela XVI:</b> Parâmetros determinados no setor da Imunologia/Hormonologia para a paciente em estudo, de interesse para o diagnóstico/monitorização de Mieloma Múltiplo.....	49
<b>Tabela XVII:</b> Critérios de diagnóstico de Mieloma Múltiplo.....	50
<b>Tabela XVIII:</b> Quadro sintomatológico característico de MM.....	51





## Abreviaturas

Ac	Anticorpo(s)
ACTH	Hormona Adrenocorticotrófica ( <i>Adrenocorticotropic hormone</i> )
AF	$\alpha$ -fetoproteína
AL	Anticoagulante Lúpico
ANA	Anticorpos anti-nucleares ( <i>Antinuclear antibodies</i> )
ANCA	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo ( <i>Antineutrophil cytoplasmic antibodies</i> )
ALT	Alanina aminotransferase
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada ( <i>activated Partial Thromboplastin Time</i> )
ASCA	Anticorpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies</i> )
AST	Aspartato aminotransferase
ATA	Anticorpos Anti-peroxidase ( <i>Anti-Thyroid peroxidase Antibodies</i> )
ATG	Anticorpos Anti-tiroglobulina
BAAR	Bacilos ácido-álcool resistentes
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
BMG	$\beta$ 2-microglobulina
CA15.3	Antigénio Carbohidrato 15.3 ( <i>Cancer antigen 15.3</i> )
CA19.9	Antigénio Carbohidrato 19.9 ( <i>Cancer antigen 19.9</i> )
CA72.4	Antigénio Carbohidrato 72.4 ( <i>Cancer antigen 72.4</i> )
CA125	Antigénio Carbohidrato 125 ( <i>Cancer antigen 125</i> )
CAM	Gelose Campyloset ( <i>Campyloset agar</i> )
CEA	Antigénio Carcinoembrionário ( <i>Carcinoembryonic Antigen</i> )
CLED	Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos ( <i>Cistine Lactose Electrolyte Deficient agar</i> )
CNA	Gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro, Colistina e Ácido Nalidixico ( <i>Colistin and Nalidixic Acid agar</i> )
COS	Gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro ( <i>Columbia+Sheep Blood agar</i> )
DHEAs	Dihidroepiandrosterona sulfato
dsDNA	DNA dupla cadeia
EA	<i>Early Antigens</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr Nuclear Antigens</i>
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
EPN	Eritropoietina
FEIA	<i>Fluorescence Enzyme Immunoassay</i>
FSH	Hormona Folículo-Estimulante ( <i>Follicle-Stimulating Hormone</i> )
GB	Glóbulos Brancos
GDH	Glutamato Desidrogenase
GGT	$\gamma$ -glutamiltransferase
GH	Hormona de Crescimento ( <i>Growing Hormone</i> )
GV	Glóbulos vermelhos
HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana ( <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> )
HE4	Proteína do Epidídimo Humano 4 ( <i>Human Epididymis protein 4</i> )
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulinas
IGF-I	<i>Insulin-like Growth Factor I</i>
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IPO	Instituto Português de Oncologia
iPTH	Paratormona ( <i>Parathyroid Hormone</i> )
ISI	<i>International Sensitivity Index</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano

LDH	Lactato Desidrogenase
LH	Hormona Luteinizante ( <i>Luteinizing Hormone</i> )
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMC	Leucemia Mielóide Crónica
MHE	Gelose Mueller-Hinton ( <i>Mueller-Hinton EUCAST<sup>®</sup> agar</i> )
MHF	Gelose Mueller-Hinton com 5% de sangue de cavalo e NAD ( <i>Mueller-Hinton Fastidious agar</i> )
MM	Mieloma Múltiplo
NSE	Neuroenolase Específica ( <i>Neuro-specific Enolase</i> )
PC	Proteína C
PCR	Proteína C Reativa
PDF	Produtos da Degradação da Fibrina
PLT	Plaquetas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PS	Proteína S
PSA	Antigénio Prostático Específico ( <i>Prostate-specific Antigen</i> )
PT	Tempo de Protrombina ( <i>Prothrombin Time</i> )
PVX	Gelose Chocolate com PolyViteX
QT	Quimioterapia
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
SCC	Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas ( <i>Squamous-cell carcinoma antigen</i> )
SGC2	Gelose Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol ( <i>Sabouraud, Gentamicin and Chloramphenicol agar</i> )
sHBG	Globulina Transportadora de Hormonas Sexuais ( <i>sexual Hormone Binding Globulin</i> )
SCS	Gelose Schaedler com 5% de sangue de carneiro ( <i>Schaedler+Sheep Blood agar</i> )
SP	Sangue Periférico
SPC	Serviço de Patologia Clínica
T3	Tri-iodotironina
T4	Tiroxina
TASO	Título de anticorpos Anti-Estreptolisina O
TG	Tiroglobulina
TIBC	Capacidade total de ligação do ferro ( <i>Total Iron Binding Capacity</i> )
TRAbs	Autoanticorpos anti-tiróide ( <i>Thyroid Stimulating Hormone Receptor Antibodies</i> )
TSA	Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos
TSH	Hormona Estimulante da Tiróide ( <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> )
TT	Tempo de Trombina
UFC	Unidades Formadoras de Colónia
VCA	<i>Viral Capsid Antigens</i>
VS	Velocidade de Sedimentação

## Resumo

As análises clínicas são uma ferramenta fundamental no rastreio, diagnóstico e seguimento de pacientes. No Instituto Português de Oncologia adquirem maior importância, uma vez que este é um hospital especializado na doença oncológica.

O principal propósito deste relatório é a descrição das atividades desenvolvidas durante os seis meses de Estágio que passei neste serviço. Durante este período de tempo, tive a oportunidade de integrar a rotina dos diferentes setores que constituem o Serviço de Patologia Clínica: Bioquímica Clínica, Hematologia, Imunologia/Hormonologia e Microbiologia. Foi-me possível adquirir conhecimentos práticos, que me permitiram ampliar os conhecimentos teóricos da minha formação académica. Tive a oportunidade de trabalhar a par com profissionais muito experientes e competentes e de aplicar o meu conhecimento à prática da realidade quotidiana.

Neste relatório são aprofundadas as áreas da Hematologia e da Microbiologia, pela sua importância a nível clínico e pelo interesse que me despertaram. É também efetuada uma breve descrição dos setores da Bioquímica Clínica e da Imunologia/Hormonologia. É ainda abordado o controlo de qualidade implementado em todos os setores do Serviço de Patologia Clínica.

## Abstract

Clinical analysis are valuable tools for screening, diagnosis and patient monitoring. At Portuguese Institute of Oncology they become even more important considering this is a hospital specialized in oncological disease.

The first meaning of this report is to describe the activities developed during the 6 months of Internship. Throughout this time I participated in the daily routine of the different sectors comprised in the Clinic Pathology Service: Clinical Chemistry, Hematology, Immunology/Hormonology and Microbiology. I was able to acquire practical knowledge which allowed me to increase the knowledge from my academic training. I had the opportunity to learn from very experient and competent professionals and to apply my knowledge to daily routine.

This report explores the areas of Hematology and Microbiology given their clinical relevance and the enthusiasm I feel about them. Clinical Chemistry and Immunology/Hormonology will be briefly described. I will still mention the quality control process followed by all sectors of Clinic Pathology Service.



## Introdução

Os diversos parâmetros analíticos têm grande importância, quer no diagnóstico médico quer na monitorização da patologia e tratamento dos doentes. Contudo, a sua importância eleva-se na área da Oncologia, seja pela multiplicidade dos sintomas ou pela escassez de tratamentos com eficácia comprovada [1,2].

Apesar de todos os esforços colocados na investigação da doença oncológica, são muitos os aspetos que escapam ao nosso conhecimento. O cancro tem uma grande incidência mundial e as previsões apontam para o aumento dos casos nas próximas décadas. Causa 25% das mortes anuais em Portugal [3], para além da degradação física do doente, do seu desgaste psicológico e dos que o rodeiam. Não representa apenas uma patologia, mas uma necessidade de cuidados médicos e de apoio generalizado. Para fazer face a esta realidade, surgiu, em 1923, o Instituto Português para o Estudo do Cancro, em Lisboa. Foi a primeira instituição em Portugal com intervenção direta no estudo e tratamento do doente oncológico, tendo dado lugar em 1927 ao Instituto Português de Oncologia (IPO), pela mão do Prof. Doutor Francisco Gentil. De forma a prestar iguais cuidados de saúde aos doentes oncológicos da região, surgiu, em 1953, o IPO de Coimbra, por ação do Prof. Doutor Luís Raposo. Até à atualidade, sofreu as alterações necessárias a um melhor funcionamento e a uma melhor prestação de cuidados ao doente oncológico [4].

Inserido no IPO de Coimbra, está o Serviço de Patologia Clínica (SPC), onde tive a oportunidade de cumprir o estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas. O laboratório compreende quatro valências: Hematologia, Bioquímica Clínica, Imunologia/Hormonologia e Microbiologia. No âmbito do programa de estágio, passei 30 dias em cada uma das valências. Neste período de tempo tive a oportunidade de integrar e colaborar com a equipa de trabalho em cada um dos setores.

Das quatro valências, foi-me permitido aprofundar as da Hematologia e da Microbiologia, áreas que me despertam grande interesse e que considero de grande importância a nível clínico. A Hematologia é uma das áreas que mais informações pode fornecer ao clínico, através das conclusões que se podem obter da variação dos parâmetros avaliados, no que respeita à evolução da doença oncológica ou do seu tratamento. A Microbiologia, sendo uma área menos automatizada, depende grandemente da competência dos Técnicos que processam as amostras. O facto de muitos dos doentes seguidos no IPO revelarem comprometimento do Sistema Imunológico eleva ainda mais o papel deste setor na salvaguarda da qualidade de vida do doente.

Será também abordado o controlo de qualidade que o laboratório realiza periodicamente, como forma de garantir a transmissão de resultados fiáveis aos clínicos.

Como forma de interligar todos os setores, será ainda discutido o caso clínico de uma doente com Mieloma Múltiplo (MM).

# I. Caracterização do Laboratório de Estágio

O Serviço de Patologia Clínica situa-se no Piso 0 do Edifício da Oncologia Médica e Laboratórios. Tem como diretor de serviço o Dr. Frederico Fernandes Monteiro Marques Valido e conta com uma equipa de 34 pessoas com formações diversas, desde Médicos, Técnicos de Saúde e Diagnóstico, Farmacêuticos, Bioquímicos, Biólogos e pessoal administrativo.

Diariamente, são efetuadas cerca de 300 a 350 colheitas para avaliação de diferentes parâmetros analíticos. O registo dos pedidos constitui uma etapa fundamental no processo analítico e é efetuado na Secretaria, a partir das requisições apresentadas por cada doente. Após o registo, as colheitas são realizadas por Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica para contentores adequados, em função das análises requisitadas pelo clínico.

As amostras colhidas a doentes internados no IPO são recebidas e registadas na Secretaria, seguindo as mesmas regras do registo de doentes de ambulatório.

Uma vez efetuada a colheita, as amostras são distribuídas pelos diferentes setores do laboratório – Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia/Hormonologia – acompanhadas das respetivas requisições. São, então, processadas de acordo com o tipo de amostra e análises a efetuar. O tipo de amostra utilizada varia nos diferentes setores do laboratório: sangue, urina, expetoração, fezes, pús e pontas de cateter no setor de Microbiologia; soro e urina no setor de Bioquímica Clínica e de Imunologia/Hormonologia; sangue total, plasma, medula óssea e tecidos de biópsias no setor de Hematologia.

Atualmente, as determinações analíticas têm uma componente de automatismo muito marcada, permitindo uma resposta rápida e eficaz perante o elevado fluxo diário de amostras. Por outro lado, o setor de Microbiologia continua muito dependente do trabalho de um Técnico qualificado, dadas as características particulares do tipo de análises realizadas. Os equipamentos utilizados nos diferentes setores estão registados na Tabela I.



**Tabela 1:** Equipamentos existentes nos diversos sectores do SPC do IPO de Coimbra e respetiva utilização.

<b>Equipamento (Marca Comercial)</b>	<b>Utilização/Tipo de Instrumento</b>
<b>BIOQUÍMICA</b>	
ABL 800 Flex (Radiometer)	Quantificação de Cálcio ionizado
Cobas® 6000 c501 (Roche Diagnostics)	Autoanalisador
Cobas® 4000 c301 (Roche Diagnostics)	Autoanalisador
RapidChem® 744 (Bayer)	Quantificação de iões
RapidLab® 1265 (Siemens)	Gasometrias
Reflotron® Plus (Roche Diagnostics)	Quantificação de ureia (química seca)
Schimadzu Spectrophotometer UV-1800 (UV Spectrophotometer)	Espetrofotómetro
<b>HEMATOLOGIA</b>	
ACL TOP® CTS 500 (Instrumentation Laboratory)	Testes de coagulação
Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Centrifuge (WESCOR)	Coloração de esfregaços de Sangue Periférico/Medula Óssea
Cytomics FC500 (Beckman Coulter)	Citometria de fluxo
Coulter LH 750 Analyzer (Beckman Coulter)	Hemograma
Test I BCL (ALI FAX)	Velocidade de sedimentação
<b>MICROBIOLOGIA</b>	
Cobas® u411 (Roche Diagnostics)	Análise sumária de urina
BD Bactec™ 9050 Blood Culture System	Estufa de Hemoculturas
Forma™ Scientific	Câmara de fluxo laminar
Vitek® 2 Compact 15 (BioMérieux)	Identificação de microrganismos e TSA
Vitek® Densicheck (BioMérieux)	Leitor de densidade ótica de suspensões bacterianas
Vitek® Systems ATB Expression (BioMérieux)	Leitor de galerias de antibiogramas
<b>IMUNOLOGIA/HORMONOLOGIA</b>	
Immulite® 2000 XPi (Siemens)	Autoanalisador
Cobas® 6000 e601 (Roche Diagnostics)	Autoanalisador
ADVIA Centaur® XP (Siemens)	Autoanalisador
ImmunoCAP™ I 100 (Thermo Scientific)	Autoanalisador
BN ProSpec® (Siemens)	Nefelómetro
Hydrasis (Sebia)	Eletroforese em gel de agarose e imunofixação
Liaison® (DiaSorin)	Autoanalisador
Kryptor (Brahms)	Autoanalisador
VIVA-E® (Siemens)	Autoanalisador
LKB Wallac 1272 CliniGammaCounter	Contador de radiação $\gamma$
Microscópio de fluorescência	Imunocitoquímica
<b>EQUIPAMENTOS COMUNS (MICROBIOLOGIA E HEMATOLOGIA)</b>	
Microscópio ótico (diversos)	Observação de esfregaços
GeneXpert® (Cepheid)	Amplificação de DNA

## 2. Atividades Desenvolvidas

Dada a natureza dos doentes abrangidos pelo IPO, o SPC está profundamente dedicado ao diagnóstico e monitorização de doenças oncológicas. Como tal, apesar de fisicamente individualizadas, todas as valências trabalham em paralelo, com o objetivo principal de fornecer ao médico resultados rápidos e fiáveis, muitas vezes essenciais ao diagnóstico clínico.

Neste serviço, tive a oportunidade de aprender e executar diversas técnicas nos diferentes setores que integrei. Essas técnicas, bem como algumas considerações teóricas, serão discutidas de seguida.

### 2.1. Hematologia

O sangue está em estreita comunicação com todas as células do nosso organismo, sendo responsável pelo transporte de qualquer substância, seja ela o oxigénio, os nutrientes que obtemos da alimentação, os xenobióticos ou os produtos tóxicos que necessitamos de eliminar. Tem ainda a função de defesa do organismo contra agentes externos, através das células do Sistema Imunológico, ou contra hemorragias, através das plaquetas e da cascata de coagulação [5]. Assim, e para cumprir eficazmente as suas funções, o sangue tem de reunir condições essenciais como a fluidez e um número adequado de células sanguíneas funcionais.

A análise dos parâmetros hematológicos é de extrema utilidade no diagnóstico e monitorização de doenças oncológicas.

#### Hemograma

É o exame mais solicitado, não apenas no setor da Hematologia mas em todo o laboratório. É efetuado a partir de sangue venoso, colhido para um tubo com EDTA-K<sub>3</sub>. Este anticoagulante é um poderoso quelante de cálcio, um fator fundamental à coagulação. A amostra deve permanecer em homogeneização até ser processada, de forma a manter as componentes celulares igualmente distribuídas e evitar a formação de microcoágulos.

O hemograma é executado de forma automática no Coulter LH 750 *Analyzer* e envolve a contagem das células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos) e das plaquetas, com diferenciação das 5 populações leucocitárias, e a avaliação das suas características. Para este efeito, o equipamento possui 3 câmaras de contagem e recorre a 3 métodos diferentes, explicitados de seguida. Previamente à realização do hemograma, o equipamento prepara uma suspensão celular pela adição da amostra a um diluente, de forma a promover um fluxo de células individualizadas nas câmaras de contagem.

### **Princípio de Coulter ou Impedância Elétrica:**

As câmaras de contagem contêm dois eletrodos, que geram e mantêm uma corrente elétrica constante. Entre os dois eletrodos, existe uma abertura de dimensões reduzidas, que permite a passagem das células sanguíneas. A passagem de uma célula nessa abertura provoca uma alteração da corrente elétrica produzida pelos eletrodos, gerando um pulso, uma vez que as células oferecem maior resistência à passagem de corrente que o diluente. O número de pulsos é proporcional ao número de células, enquanto a sua amplitude é proporcional ao volume da célula que o gerou.

Numa das câmaras é feita a contagem de eritrócitos (partículas com volume entre 36 e 360 fl) e plaquetas (partículas com volume entre 2 e 20 fl). Após a contagem, o equipamento constrói um histograma de eritrócitos e um histograma de plaquetas, através da relação entre o número de células contabilizadas e o seu volume.

De forma semelhante, os leucócitos são contados noutra câmara após um pré-tratamento da amostra. É adicionada uma solução lisante, que provoca a hemólise e a oxidação da hemoglobina a cianometahemoglobina. É também adicionada uma solução que estabiliza os leucócitos, mantendo-os íntegros. Os leucócitos são então contados e correspondem às partículas com volume superior a 35 fl, após hemólise [6,7].

### **Espetrofotometria:**

Ainda na câmara de contagem dos leucócitos, esta é a técnica utilizada para quantificar a hemoglobina. Após a sua oxidação a cianometahemoglobina, é medida a absorvância da solução a 525 nm [6,7].

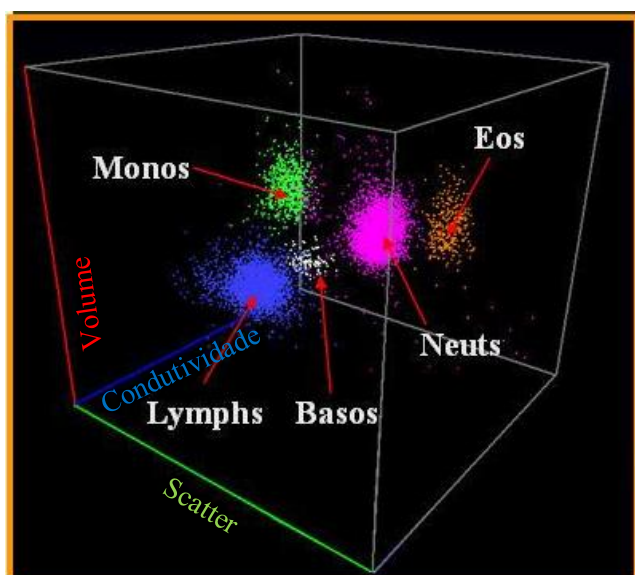
### **Tecnologia VCS:**

Por fim, na última câmara é feita a contagem diferencial de leucócitos, isto é, os leucócitos são contados e classificados de acordo com as suas características em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Para isso, os eritrócitos são lisados e são avaliados 3 parâmetros:

- i. Volume das células, por impedância elétrica de corrente de baixa frequência (princípio de Coulter);
- ii. Condutividade da célula, por impedância elétrica de corrente de alta frequência: as alterações da condutividade permitem detetar o conteúdo celular e a forma do núcleo;
- iii. *Scatter* (dispersão) de luz laser: permite avaliar as características da superfície celular (granulações), a sua forma e a capacidade de reflexão da luz.

Com base nestas características, é construído um histograma tridimensional (Figura 1). Por vezes, estão presentes GV imaturos no sangue periférico (eritroblastos).

Estas células nucleadas resistem à hemólise e são contadas juntamente com os GB. No histograma, situam-se logo abaixo dos linfócitos, por terem um volume menor e capacidade de reflexão da luz semelhante. São designadas por NRBC (*Nucleated Red Blood Cells*), e o resultado é dado em percentagem, por cada 100 leucócitos contados [6,7,8].



**Figura I:** Histograma tridimensional da distribuição populacional dos leucócitos. Lymphs: linfócitos; Basos: basófilos; Neuts: neutrófilos. Eos: Eosinófilos; Monos: monócitos.  
Adaptado de [https://classconnection.s3.amazonaws.com/352/flashcards/1698352/jpg/coulter\\_scatter1345006325459.jpg](https://classconnection.s3.amazonaws.com/352/flashcards/1698352/jpg/coulter_scatter1345006325459.jpg)

Há ainda outros parâmetros que constam no hemograma, alguns dos quais são determinados indiretamente. Esses parâmetros são esclarecidos na Tabela II.

**Tabela II:** Outros parâmetros abrangidos pelo hemograma [6,7].

Parâmetro		Determinação
VCM (Volume Corpuscular Médio)	Volume médio dos GV.	Direta A partir da amplitude dos pulsos captados durante a contagem de GV.
RDW ( <i>Red cell Distribution Width</i> )	Índice de dispersão do volume dos GV: corresponde ao coeficiente de variação de volume dos GV contados.	Direta A partir da distribuição das amplitudes dos pulsos captados durante a contagem de GV.
VPM (Volume Plaquetar Médio)	Volume médio das plaquetas.	Direta A partir da amplitude dos pulsos captados durante a contagem de plaquetas.
PDW ( <i>Platelet Distribution Width</i> )	Índice de dispersão do volume das Plaquetas: corresponde ao coeficiente de variação de volume das plaquetas.	Direta A partir da amplitude dos pulsos captados durante a contagem de plaquetas.

**Tabela II (continuação)**

Hct (Hematócrito)	Relação entre o volume ocupado pelos GV e o volume total de sangue.	Indireta $Hct (\%) = GV (x10^{12}/l) \times VCM (x10^{-15}/l) \times 100$
HCM (Hemoglobina Corpuscular Média)	Hemoglobina existente em cada GV, em média.	Indireta $HCM (g) = Hemoglobina (g/l) \div GV (x10^{12}/l)$
CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média)	Concentração de hemoglobina existente em cada GV, em média.	Indireta $CHCM (g/l) = Hemoglobina (g/l) \div Hct (l/l)$

### Contagem de Reticulócitos

Os reticulócitos são uma forma imatura dos GV e, portanto, uma forma de monitorizar doentes em recuperação de anemias hemolíticas. Nestes casos, quando existe uma medula óssea responsiva, o organismo acelera a eritropoiese, lançando formas imaturas de GV para o sangue periférico. A contagem de reticulócitos compreende 3 fases:

- i. Incubação da amostra com um corante supravital: a amostra é incubada com Azul de Metileno Novo, um corante que precipita o RNA basófilo característico dos reticulócitos;
- ii. Remoção do excesso de corante: os reticulócitos coram de azul, os GV não adquirem o corante porque não têm RNA;
- iii. Contagem pela tecnologia VCS [6,7].

Muitas vezes, o hemograma pode apresentar alterações ao nível de alguns parâmetros. Durante o meu estágio no setor da Hematologia, tive a possibilidade de analisar alguns resultados de pacientes e de enquadrá-los na sua situação clínica. As alterações que encontrei mais frequentemente estão descritas na Tabela III.

Além destas alterações, podem ainda encontrar-se défices de várias linhagens celulares em simultâneo. É frequente a anemia acompanhada de trombocitopenia (défice de plaquetas) ou ainda a pancitopenia (défice de todas as linhas celulares), muitas vezes como resultado da Quimioterapia. Durante o estágio, acompanhei o caso de uma doente que apresentava sistematicamente pancitopenias muito acentuadas em consequência da toxicidade dos fármacos que utilizava para o tratamento de um Linfoma.

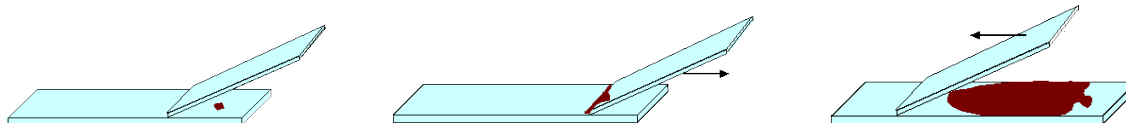
**Tabela III:** Alterações no hemograma mais frequentes e causas mais comuns no SPC.

Parâmetro alterado	Causas mais comuns
Hemoglobina (anemia)	Anemia sideropénica, Leucemia Mielóide Crónica, Mieloma Múltiplo, Quimioterapia.
Anemia macrocítica (aumento do VCM)	Quimioterapia
Anemia microcítica (diminuição do VCM)	Sideropenia
Leucócitos	
Neutropenia (défice de Neutrófilos)	Quimioterapia
Neutrofilia (aumento de Neutrófilos)	Infeção bacteriana, tratamento com fatores de crescimento.
Linfocitose (aumento de Linfócitos)	Infeção viral, Leucemia Linfocítica Crónica.
Monocitose (aumento de Monócitos)	Monocitose reativa, Leucemia Mielóide Crónica.

## Esfregaço de Sangue Periférico (SP)

Efetua-se sempre que for requisitado pelo clínico ou sempre que seja necessário esclarecer resultados do hemograma, como leucocitose, monocitose, linfocitose ou quando o autoanalisador não determina a fórmula leucocitária. Para além disso, é muito importante para a deteção de células anómalas ou de células imaturas no sangue periférico. Este último ponto pode ser determinante no diagnóstico de doenças como o mieloma múltiplo ou leucemias. Assim, é muito importante realizar um esfregaço de boa qualidade, analogamente ao ilustrado na figura 2.

No SPC os esfregaços de sangue periférico são efetuados manualmente, pelo que me foi permitido aprender e aperfeiçoar esta técnica durante o período de estágio.



**Figura 2:** Modo de preparação de um esfregaço de SP.

Adaptado de <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/bloodcytology.html>

Depois de seco, o esfregaço deve ser fixado e corado. Ambos os passos são executados automaticamente, no *Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Centrifuge*. O esfregaço é fixado com metanol, ao que se segue uma coloração de Wright-Giemsa modificada:

- i. Tiazina, um corante básico, vai conferir coloração azul ou roxa às estruturas ácidas (núcleo dos GB, grânulos de neutrófilos e basófilos, granulação citotóxica);
- ii. Eosina, um corante ácido que vai corar estruturas básicas de rosa ou laranja (citoplasma dos GB, eritrócitos, grânulos de eosinófilos).

O dispositivo utiliza a função de centrifugação para remover o excesso de corante e secar as lâminas após a coloração [9,10].

O esfregaço deve observar-se inicialmente numa baixa ampliação (objetiva de 10x ou 20x), para detetar possíveis agregados de plaquetas ou de GV e para selecionar a melhor zona do esfregaço para se observar. Deve escolher-se uma zona em que os GV não estejam muito aglomerados nem muito isolados, para que a morfologia celular não seja adulterada. Deve aumentar-se gradualmente a ampliação e observar-se atentamente todas as linhas celulares, registando quaisquer alterações à normalidade [11]. Nesta observação devem caracterizar-se morfologicamente as células sanguíneas, tendo em atenção os aspetos resumidos na Tabela IV.

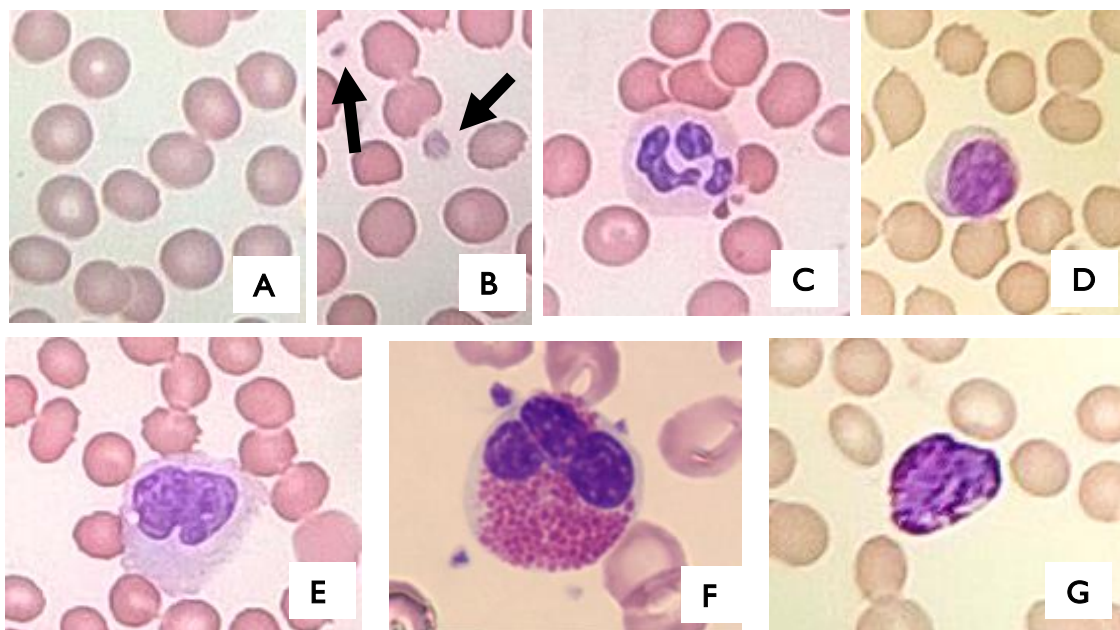
**Tabela IV:** Aspetos mais importantes a considerar num esfregaço de SP.

<b>Linha celular</b>	<b>Aspetos a considerar</b>
PLT	Presença de agregados; anisocitose plaquetar.
GV	Policromasia; anisocitose; poiquilocitose; GV em pilha de moedas (rouleaux); presença de células imaturas (eritroblastos).
GB	Determinação da fórmula leucocitária.
	Caracterização do núcleo (hipo/hiperlobulado, presença de nucléolos, aparência da cromatina).
	Caracterização do citoplasma (presença de granulações não características, presença de vacúolos).
	Presença de células não habituais: células imaturas (blastos, mielócitos, metamielócitos), células linfoplasmocitárias.
Anisocitose: variação do tamanho das células de uma determinada linhagem; Policromasia: variação da coloração dos GV; Poiquilocitose: variação da forma das células de uma determinada linhagem.	

De forma a fazer-se a melhor avaliação possível é fundamental um bom conhecimento das células sanguíneas. A sua aparência habitual em pessoas saudáveis é apresentada na figura 3.

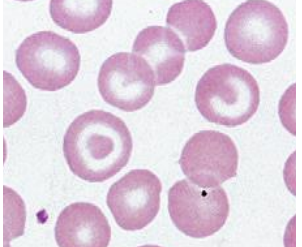
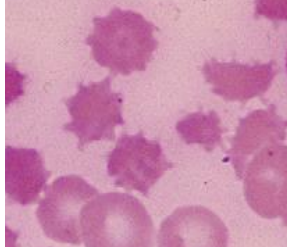
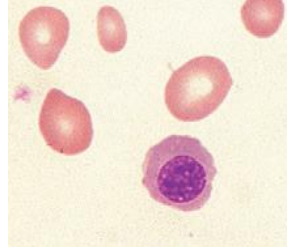
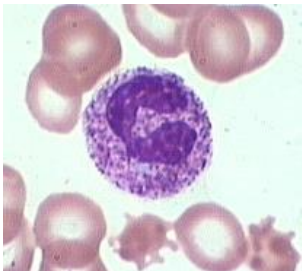
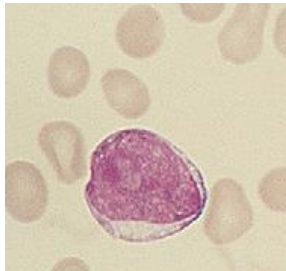
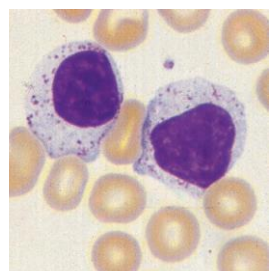
A fórmula leucocitária é determinada pela contagem de pelo menos 100 GB na objetiva de 100x (imersão em óleo). Devem ser incluídas nesta fórmula os GB imaturos que estejam presentes [11].

É também fundamental mencionar quaisquer características anómalas que sejam visualizadas, quer nos GB quer nas outras células sanguíneas. Em muitas situações, a visualização do esfregaço de SP pode fazer o diagnóstico de uma patologia ou avaliar a eficácia de um tratamento. Na Tabela V (onde se incluem as Figuras 4 a 9) estão representadas as alterações do esfregaço de SP mais frequentes no SPC.



**Figura 3:** Células sanguíneas de um indivíduo saudável. Observação ao microscópio óptico com a objetiva de 50x. A: GV; B: Plaquetas; C: Neutrófilo; D: Linfócito; E: Monócito; F: Eosinófilo; G: Basófilo.  
 Fonte: A, B, C, D e G – Fotos SPC-IPOC; F – [http://www.mwap.co.uk/path\\_eosinophil\\_photo.png](http://www.mwap.co.uk/path_eosinophil_photo.png).

**Tabela V:** Alterações frequentemente encontradas em esfregaços de sangue periférico no SPC.

Linha celular	Alterações mais frequentes		
GV	 <p><b>Figura 4:</b> Poiquilocitose: células em alvo.            Adaptado de BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, p. 78</p>	 <p><b>Figura 5:</b> Poiquilocitose: células crenadas.            Adaptado de BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, p. 82</p>	 <p><b>Figura 6:</b> Presença de eritroblastos no SP.            Adaptado de BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, p. 72</p>
GB	 <p><b>Figura 7:</b> Neutrófilos com granulação citotóxica.            Fonte: <a href="https://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/wcd/qualitative.cfm">https://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/wcd/qualitative.cfm</a></p>	 <p><b>Figura 8:</b> Presença de blastos no SP.            Adaptado de BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, p. 97</p>	 <p><b>Figura 9:</b> Linfócitos ativados.            Adaptado de BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, p. 95</p>



## **Velocidade de Sedimentação (VS)**

A velocidade de sedimentação corresponde à velocidade (em mm/h) a que os GV sedimentam no plasma. Apesar de inespecífico, é um teste bastante requisitado. É realizado na amostra colhida para o hemograma.

O valor da VS aumenta na resposta inflamatória, por exemplo, em infecções e também nas gamopatias como o mieloma múltiplo, pois são situações em que aumentam algumas proteínas plasmáticas. Estas proteínas (proteína C reativa, ceruloplasmina, haptoglobina, imunoglobulinas) neutralizam as cargas membranares dos GV, diminuindo a repulsão entre eles e, portanto, facilitando a sua agregação.

A VS é determinada automaticamente no *Test I BCL*, por fotometria cinética (infravermelho). Este equipamento deteta, num sistema capilar, a formação de agregados de GV e as suas dimensões, através de alterações da densidade ótica da amostra. Faz 50 medições por segundo, durante 20 segundos (um total de 1000 medições), mantendo sempre a amostra a uma temperatura constante de 37°C.

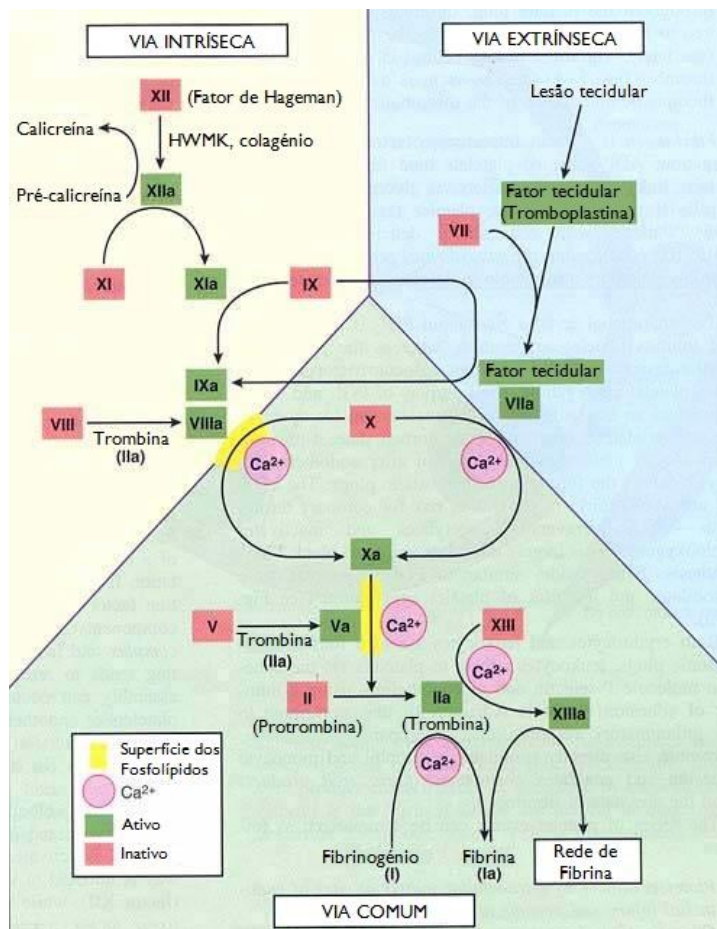
Quando a amostra tem um volume demasiado baixo para se efetuar a VS automática, o teste pode fazer-se manualmente pelo método de Westergren. Com uma pipeta de vidro apropriada para o efeito, aspira-se 200 mm de amostra e coloca-se a pipeta em posição vertical. Passada 1h, regista-se qual foi a sedimentação dos GV (quantos mm desceram em relação ao volume inicial) [12,13].

## **Provas de Hemostase**

A hemostase é a capacidade de um organismo controlar uma hemorragia. Depende da ativação, adesão e agregação plaquetar (hemostase primária) e de mecanismos que levam à formação de coágulos, designados no seu conjunto por cascata de coagulação (hemostase secundária). No entanto, é necessário haver um equilíbrio entre os mecanismos de coagulação e os mecanismos responsáveis pela dissolução do coágulo: a coagulação exacerbada traz riscos trombóticos e o seu défice está associado a riscos hemorrágicos [14].

As provas de hemostase são efetuadas a partir de plasma. A amostra de sangue é colhida para um tubo com citrato de sódio, um rápido e poderoso quelante de cálcio. É muito importante que seja respeitada a proporção amostra-anticoagulante de 9:1. O volume de anticoagulante é bastante significativo, pelo que a utilização de um volume de amostra diferente do previsto irá alterar o fator de diluição e refletir-se nos resultados obtidos.

De forma a facilitar a interpretação dos resultados das provas de coagulação, é frequente considerar-se a existência de duas vias distintas, capazes de desencadear a coagulação. A figura 10 esquematiza as duas vias consideradas, habitualmente designadas por cascata de coagulação.



**Figura 10:** Cascata de coagulação. HMWK: Cininogénio de Alta Massa Molecular. Adaptado de [http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5200/01\\_circulation/hemostasis/hemostasis04.html](http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5200/01_circulation/hemostasis/hemostasis04.html)

A via intrínseca é ativada por exposição do plasma a superfícies com carga negativa (como o colagénio, exposto após uma lesão num vaso sanguíneo). A via extrínseca é ativada pelo fator tecidual, libertado quando há lesão dos tecidos. Ambas as vias requerem fosfolípidos e cálcio para despoletar a formação de um coágulo de fibrina [5].

Antes da realização dos testes a amostra é centrifugada a 3000 r.p.m. por 10 minutos, obtendo-se um plasma pobre em plaquetas (PPP). É importante eliminar a interferência das plaquetas uma vez que são ativadoras naturais da cascata de coagulação. A partir deste plasma são efetuados os testes de coagulação no ACL TOP® CTS 500, que deteta a formação de fibrina por turbidimetria [15].

### Tempo de Protrombina (PT):

É dado pelo tempo que a rede de fibrina demora a ser detetada, após adição do reagente (tromboplastina, fosfolípidos e  $\text{Ca}^{2+}$ ) à amostra de PPP. O PT aumentado pode dever-se ao défice de um de vários fatores de coagulação (II, V, VII e X) ou até de fibrinogénio, pelo que é

um bom indicador da eficácia da via extrínseca. Também é aumentado pelo déficit de vitamina K e pelos anticoagulantes inibidores da vitamina K (como a varfarina), motivo pelo qual é utilizado na monitorização da terapêutica.

Durante muito tempo, o PT era dado apenas em segundos, mas, na tentativa de se uniformizarem os resultados obtidos por laboratórios diferentes, surgiu o *International Normalized Ratio* (INR). Este é um resultado calculado, através da fórmula seguinte:

$$\text{INR} = (\text{PT do doente} / \text{PT controlo})^{\text{ISI}}$$

Em que: o PT do doente é o obtido no teste; o PT controlo é a média dos PT de 20 pacientes sem patologia de coagulação; o ISI é o índice de normalização da tromboplastina usada no ensaio, em relação à tromboplastina de referência [16].

O PT pode ainda ser dado em percentagem, um valor obtido da relação entre PT obtido para o doente e o PT controlo.

#### **Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT):**

Este teste utiliza a sílica como ativador de contacto da coagulação e um reagente com  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos. Estes três elementos estimulam a coagulação da amostra, e o tempo de formação do coágulo é medido e o resultado dado em segundos.

O aumento do aPTT pode dever-se ao déficit dos fatores de coagulação XII, XI, X, IX, VIII, V, II, fator de vonWillebrand ou de fibrinogénio, pelo que é um indicador da eficácia da via intrínseca. Anticoagulantes inibidores da vitamina K também levam ao aumento do aPTT, bem como déficit de vitamina K ou presença de inibidores da coagulação. É utilizado na monitorização da terapêutica com heparina [17].

Quando o aPTT está aumentado, é importante verificar o motivo dessa alteração: se é o déficit de algum dos fatores de coagulação envolvido ou a presença de um inibidor. Para determinar a razão da alteração, adiciona-se à amostra uma mistura de plasmas obtida a partir de indivíduos com aPTT normais, na proporção de 1:1.

Repete-se a determinação do aPTT e, se houver correção do valor inicial, pode concluir-se que o aumento é devido ao déficit de um dos fatores de coagulação, que foi colmatado com os fatores existentes na mistura de plasmas. Se o aPTT não corrigir, o aumento deverá ser causado por um inibidor da coagulação, sendo o anticoagulante lúpico o mais comum.

#### **Tempo de Trombina (TT):**

Neste teste avalia-se o tempo que o fibrinogénio da amostra demora a ser convertido em fibrina, após a adição de trombina ao plasma. No que respeita aos agentes intervenientes na coagulação, este teste está dependente exclusivamente da quantidade de fibrinogénio, pelo

que qualquer anomalia nos fatores das vias intrínseca ou extrínseca não será detetada. O TT avalia apenas a eficácia da via comum da cascata de coagulação, e pode ser utilizado para monitorizar terapêuticas anticoagulantes com heparina ou com inibidores diretos da trombina, casos em que estará aumentado. Também sofre alteração em casos de disfibrinogenémia (défice de fibrinogénio) ou excesso de produtos de degradação da fibrina (PDF) [17].

#### **Quantificação do Fibrinogénio (Método de Clauss):**

Esta determinação é efetuada após adição de excesso de trombina à amostra de plasma. A elevada concentração de trombina em relação ao fibrinogénio existente no plasma torna a coagulação dependente apenas dos níveis de fibrinogénio.

Mede-se o tempo de coagulação da amostra e o fibrinogénio é quantificado através de uma curva de calibração construída com base em diluições seriadas de um plasma de referência. Este teste é afetado pela disfibrinogenémia e por grandes quantidades de produtos de degradação do fibrinogénio [18].

#### **Quantificação de D-Dímeros:**

A coagulação do plasma resulta na formação de uma rede de fibrina estabilizada pelo fator XIIIa. Essa rede de fibrina é, posteriormente, degradada pela plasmina, gerando produtos de degradação do fibrinogénio com um domínio antigénico denominado D-dímero.

A quantificação dos D-dímeros é feita por imunoturbidimetria. É adicionada à amostra de plasma uma suspensão de partículas de látex combinadas com Ac monoclonais específicos para os D-dímeros. A quantificação baseia-se na medida da aglutinação das partículas de látex, por turbidimetria.

O aumento dos níveis de D-dímeros indica ativação da coagulação, e pode acontecer na gravidez, inflamação ou doenças malignas. É útil na monitorização de doenças trombóticas, como a trombose venosa profunda, e de terapêutica com anticoagulantes [19].

#### **Deteção de Anticoagulante Lúpico (AL):**

O anticoagulante lúpico foi detetado pela primeira vez em doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico, daí a sua designação. Contrariamente ao que seria expectável, não está associado a risco hemorrágico *in vivo*, mas sim a risco trombótico [20].

*In vitro*, o Anticoagulante Lúpico é um Ac anti-fosfolípidos, que afeta a coagulação através do sequestro dos fosfolípidos. Provoca um aumento do aPTT, e a sua deteção faz-se sempre que o aPTT não corrige após adição à amostra de uma mistura de plasmas de aPTT normal. O teste é realizado após duas centrifugações da amostra, a 3000 r.p.m. durante 10

min e a 4°C. A centrifugação adicional tem como objetivo eliminar qualquer interferência plaquetar residual no resultado do teste [20,21].

Para despoletar a coagulação, é utilizado um reagente com fosfolípidos,  $\text{Ca}^{2+}$  e veneno de víbora de Russell, responsável pela ativação do fator X. São efetuados dois ensaios em paralelo:

i. *Screening*: reagente com baixa concentração de fosfolípidos. O AL é capaz de neutralizar os fosfolípidos e aumentar o tempo de coagulação, tornando o teste muito sensível na sua deteção;

ii. Confirmação: reagente com elevada concentração de fosfolípidos. Os fosfolípidos em excesso não são completamente neutralizados pelo AL, tornando o tempo de coagulação da amostra mais próximo de valores normais.

Se a coagulação no teste de confirmação se der num tempo considerado normal é porque existe AL. Caso o tempo se mantenha aumentado, a coagulação estará a ser afetada por um outro inibidor.

O resultado é dado com base no rácio entre os tempos de coagulação obtidos nos dois ensaios. O teste é dado como positivo ou negativo se esse rácio for, respetivamente, superior ou inferior a um *cut-off* [23].

#### **Determinação da atividade do fator VII:**

A atividade do fator VII da cascata de coagulação é determinada em pacientes com PT aumentado, uma vez que essa alteração pode dever-se ao défice deste fator de coagulação. O défice de fator VII está associado a risco hemorrágico.

Para esta determinação é adicionado à amostra um plasma deficitário em fator VII e medido o PT da mistura. A correção do PT do plasma deficitário em fator VII (reagente) é proporcional à atividade deste fator na amostra do paciente, sendo os valores absolutos obtidos com base numa curva de calibração.

De forma análoga, pode determinar-se a atividade do fator V.

#### **Determinação da atividade do fator VIII:**

O défice de fator VIII leva a uma situação patológica designada por Hemofilia e está associado a risco hemorrágico [20]. A atividade do fator VIII é determinada em pacientes com aPTT aumentado, quando o valor é normalizado por adição da mistura de plasmas normais.

Nesta prova é medido o aPTT da mistura obtida pela adição do reagente (plasma deficitário em fator VIII) à amostra do paciente, de forma idêntica ao descrito para a

determinação da atividade do fator VII. A correção do aPTT do plasma deficitário em fator VIII é proporcional à atividade deste fator na amostra do paciente.

O déficit de fator VIII pode também ser causado por déficit de fator de von Willebrand (doença de von Willebrand).

#### **Determinação da atividade da Proteína C (PC):**

A PC é um inibidor da coagulação dependente de vitamina K. É ativada pela trombina e funciona apenas na presença de fosfolípidos e da Proteína S (PS), que atua como coenzima. Quando ativada, degrada os fatores Va e VIIIa, impedindo a formação do coágulo, e o seu déficit está associado a um risco trombótico elevado.

A determinação da atividade da PC inicia-se com a sua ativação por veneno de serpente. Adiciona-se depois um substrato cromogénico, cuja degradação é monitorizada por espectrofotometria.

#### **Determinação da Proteína S livre (PS):**

A PS funciona como coenzima da PC, permitindo a sua ação inibidora da coagulação. Tal como a PC, o seu déficit tem risco trombótico associado.

A determinação da PS é realizada por imunoturbidimetria. Após adição à amostra de partículas de látex com Ac monoclonais anti-PS, a aglutinação é detetada por turbidimetria.

As provas de coagulação requisitadas com maior frequência no SPC são o PT, o aPTT, o TT e a quantificação de D-Dímeros. Menos frequentemente é solicitada a quantificação do Fibrinogénio, sendo que os restantes testes são pedidos muito raramente.

### **Medulograma**

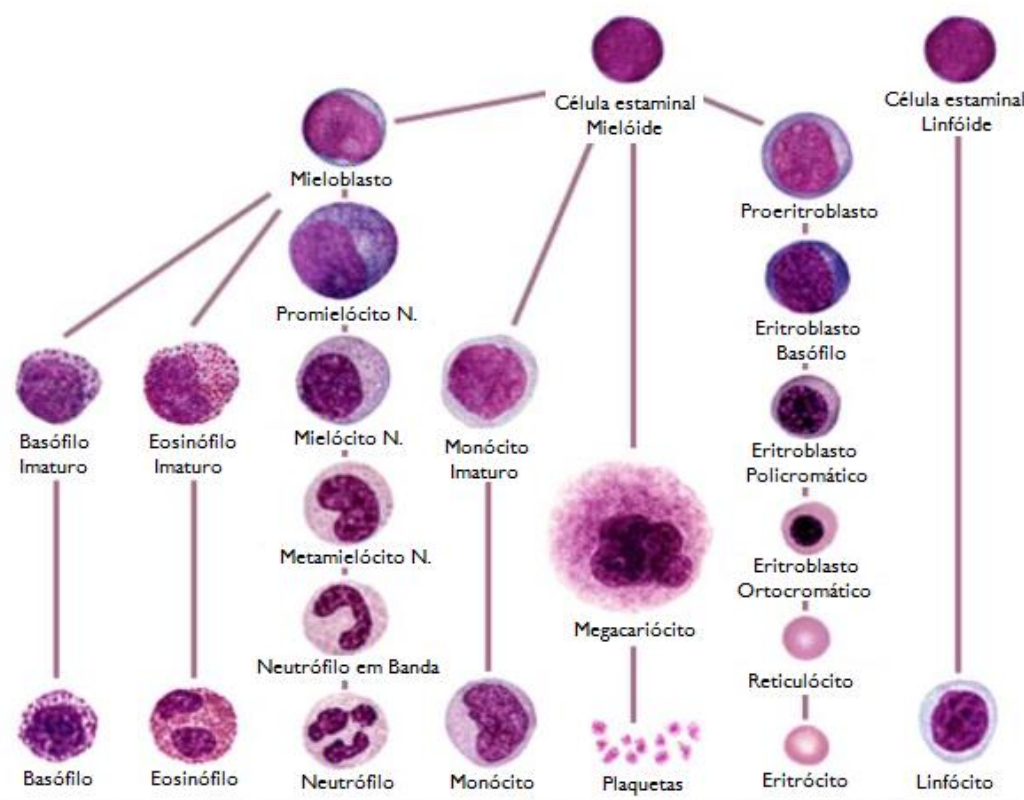
Muitas vezes, a análise detalhada dos parâmetros hematológicos não é suficiente para o diagnóstico de doenças que afetam as células sanguíneas. Nestes casos, pode tornar-se necessária a análise da medula óssea. É na medula óssea que se formam as células sanguíneas, portanto, se existir alguma anomalia na hematopoiese (Figura 11) é na medula que é mais fácil a sua deteção [23].

A amostra deve ser colhida para tubo com EDTA e devem preparar-se esfregaços para posterior observação. Num esfregaço de medula óssea devem observar-se a celularidade e os depósitos de ferro.

Para observação da celularidade, os esfregaços de medula óssea são corados pela técnica de Wright-Giemsa modificada, como foi descrito para os esfregaços de sangue periférico

[9,10]. Deve iniciar-se a observação em baixa ampliação (objetiva de 10x), para procurar fragmentos de medula óssea, e depois, avaliar se a medula é normo, hiper ou hipocelular. Devem ainda procurar-se e caracterizar-se os megacariócitos. Em maior ampliação (objetiva de 100x, de imersão em óleo), deve identificar-se a linhagem a que pertencem as diferentes células, o seu estado de maturação e fazer a sua contagem diferencial (à semelhança da determinação da fórmula leucocitária no sangue periférico) [23].

Para observação dos depósitos de ferro, deve realizar-se a coloração de Perl's, após fixação do esfregaço com metanol. Esta técnica utiliza ferrocianeto de potássio ácido como corante, fazendo os iões férricos corar de azul, e permitindo avaliar os depósitos de ferro nos eritroblastos da medula óssea [23].



**Figura 11:** Hematopoiese.  
Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgkCoAL/I-hemato-introd>

Durante o estágio no setor de Hematologia foi-me possível efetuar e corar alguns esfregaços de medula óssea. Tive ainda a oportunidade de os observar ao microscópico e de avaliar, identificar e contar as diferentes células.

### Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de imunofenotipagem baseada na deteção e contagem de células que passam em frente a um laser. As células são previamente marcadas com anticorpos específicos para determinados antígenos existentes na membrana celular.

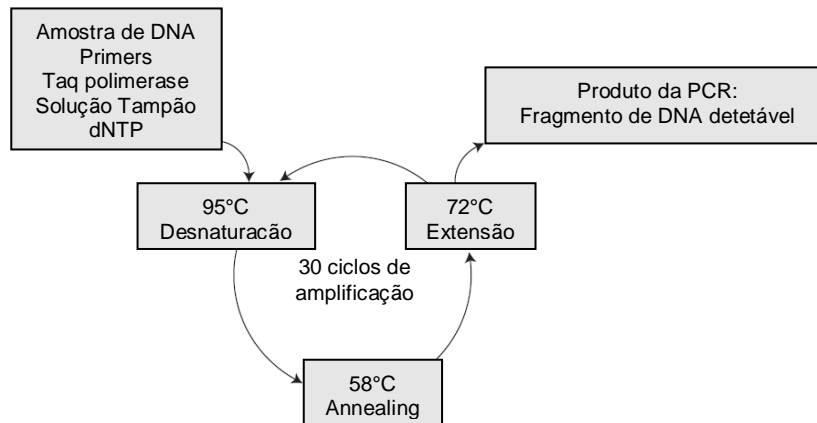
Cada anticorpo está conjugado com um fluorocromo diferente, com emissão de fluorescência a comprimentos de onda diferentes. Assim, as células são distinguidas com base nas suas dimensões, capacidade de refração da luz e fluorescência emitida. Da mesma forma, podem usar-se anticorpos contra alvos intracelulares (citoplasma ou membrana nuclear, por exemplo) após permeabilização da membrana celular.

Após marcação das células com os anticorpos adequados, a aquisição dos dados é feita no *Cytomics FC500*, onde se distinguem as células das diversas linhagens. Esta é uma técnica rápida e útil no diagnóstico diferencial entre diversas doenças linfoproliferativas [24].

### Deteção do gene BCR-ABL

O gene BCR-ABL é um gene de fusão resultante de uma translocação entre os cromossomas 9 e 22 (t(9,22)), originando o chamado cromossoma de Philadelphia (Ph). O gene BCR-ABL codifica uma proteína de fusão com atividade tirosina cinase aumentada, que altera as proteínas e os ciclos celulares. Provoca uma replicação desmesurada de células com características anómalas e está associado ao aparecimento de Leucemia Mielóide Crónica [25].

O gene pode ser detetado por uma reação de polimerização em cadeia no *GeneXpert*<sup>®</sup>, a partir de uma amostra de sangue total em tubo com EDTA (Figura 12).



**Figura 12:** Representação esquemática da amplificação de DNA por reação de polimerização em cadeia. Adaptado de BAIN, B.J. et al. – *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Elsevier, 2011, p. 141.

A citometria de fluxo e a deteção do gene BCR-ABL são técnicas pouco solicitadas. Por este motivo, tive pouco contacto com elas e não são descritas detalhadamente.



## 2.2. Bioquímica Clínica

Ao setor da Bioquímica Clínica chegam maioritariamente amostras de sangue total, em tubo com esferas ativadoras da coagulação. É necessário aguardar que o sangue retraia completamente e, então, procede-se à centrifugação da amostra a 3000 r.p.m., durante 10 minutos. Consegue-se, assim, separar o soro dos restantes componentes sanguíneos. Em geral, o soro é a amostra utilizada para as diferentes determinações neste setor do SPC.

Neste setor, a esmagadora maioria das determinações é feita de forma automatizada. A Tabela VI sumaria os parâmetros analisados, bem como o equipamento e o método utilizados para o efeito.

**Tabela VI:** Parâmetros analisados no setor da Bioquímica Clínica e método utilizado, discriminados por equipamento.

Determinação	Método/Técnica
<b>Cobas® 6000 e Cobas® 4000 <sup>a</sup></b>	
Ureia, Glicose, AST, ALT, LDH, Creatina cinase, Amónia	Enzimático
Proteínas totais no soro, Bilirrubina direta, Ferro sérico, Cobre	Químico
Albumina, Colesterol total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL, Triglicéridos, Bilirrubina total, Ácido úrico, Magnésio, Fosfatase Alcalina, Fosfatase Ácida Total, Fosfatase Ácida Prostática, GGT, Amilase, Lipase	Enzimático
Sódio	Potenciometria indirecta
Potássio	
Cloro	
Cálcio total	Espetrofotometria
Fósforo	Químico
Creatinina	Enzimático
TIBC	Químico
Hemoglobina Glicosilada	Imunoturbidimetria <sup>b</sup>
Proteínas na urina	Turbidimetria
<b>ABL 800 Flex <sup>c</sup></b>	
Cálcio ionizado	Potenciometria direta

<sup>a</sup> Determinações efetuadas maioritariamente no soro. Os mesmos analitos podem ser quantificados na urina, LCR, líquido pleural e líquido ascítico.

<sup>b</sup> Determinação em sangue total com EDTA.

<sup>c</sup> Determinação em amostra de sangue total com heparina-lítio. Este equipamento quantifica o cálcio ionizado e corrige o valor obtido para o pH fisiológico, tendo em conta o pH da amostra [26].

## 2.3. Imunologia/Hormonologia

A maioria das análises no setor da Imunologia/Hormonologia realiza-se no soro. A colheita de sangue total é efetuada para um tubo que contém esferas ativadoras da coagulação e um gel, que servirá de barreira após a centrifugação a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. O soro fica, então, separado dos restantes componentes sanguíneos pela barreira de gel, permitindo uma maior estabilidade de algumas hormonas. Na Tabela VII estão indicados os parâmetros analisados de forma automática neste setor, o equipamento e o método utilizados.

**Tabela VII:** Parâmetros analisados de forma automática na Imunologia/Hormonologia, por equipamento e método utilizados.

Determinação	Método/Técnica
<b>Immulite® 2000 XPi</b>	
CEA, AF, BMG, HCG, PSA (livre e total), TSH, ATG, ATA, TG, Calcitonina, Prolactina, ACTH <sup>a</sup> , IGF-I, GH, sHBG, EPN, Gastrina, Δ4 Androstenediona, IgE total	Quimioluminescência
<b>ADVIA Centaur® XP</b>	
iPTH, FSH, LH, Estradiol, Progesterona, DHEAs, Ferritina, Vitamina D total	Quimioluminescência
<b>Kryptor</b>	
CA 15.3, SCC, NSE, Procalcitonina, Cromogranina A	Fluorescência Amplificada por Criptato (TRACE)
<b>Cobas® 6000</b>	
CA 125, CA 19.9, CA 72.4, Cyfra 21.1, Osteocalcina, T3 (livre e total), T4 (livre e total), TRAbs, TG (2ª geração), Cortisol, Cortisol urinário <sup>b</sup> , HE4, peptídeo C, insulina, ácido fólico, vitamina B12, testosterona total, Ac anti- <i>Treponema pallidum</i> (IgG e IgM)	Eletroquimioluminescência
<b>Liaison®</b>	
Mioglobina, CK-MB, Troponina I, Renina <sup>c</sup> , Ac anti-Rubéola (IgM e IgG), anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (IgM e IgG) e anti-EBV (EBNA, VCA, EA)	Quimioluminescência
<b>BN ProSpec®</b>	
PCR, TASO, Ceruploplasma, Transferrina, Haptoglobina, fator reumatoide, α1-antitripsina, fatores do complemento C3 e C4, IgG, IgA, IgM, cadeias leves livres κ e λ (soro e urina de 24h)	Nefelometria
<b>Viva-E®</b>	
Carbamazepina, Fenitoína, Fenobarbital, Ácido Valpróico, Metotrexato, Digoxina	Fluorescência Amplificada por Criptato (TRACE)
<b>ImmunoCAP™ 100</b>	
Autoanticorpos IgG e IgM (artrite reumatóide, doença celíaca, lupus, vasculites, entre outros)	Ensaio Imunoenzimático Fluorescente (FEIA)

<sup>a</sup> Hormona termolábil, requer transporte e centrifugação da amostra a 4°C; congelada após processamento.

<sup>b</sup> Quantificação após extração com diclorometano.

<sup>c</sup> Hormona termolábil, requer transporte e centrifugação da amostra à temperatura ambiente.

De entre as determinações efetuadas, destacam-se:

- i. marcadores tumorais (AF, CEA, PSA, CA 125, NSE, SCC, TG, entre outros);
- ii. hormonas (TSH, ACTH, cortisol, FSH, LH, estradiol, progesterona, testosterona, entre outras);
- iii. proteínas (ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, imunoglobulinas, etc.);
- iv. fármacos (carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, ácido valpróico, metotrexato, digoxina).

## Técnicas Manuais

Neste setor, ainda há muitas hormonas e metabolitos quantificados por métodos manuais, devido à maior especificidade e sensibilidade que oferecem, comparativamente às técnicas automáticas. Na Tabela VIII são apresentadas as técnicas manuais executadas no setor, bem como o método utilizado.

**Tabela VIII:** Técnicas manuais efetuadas no setor da Imunologia/Hormonologia e respetivo método.

Determinação	Técnica
Iodo Urinário	ELISA
Aldosterona, Testosterona livre, 17-hidroxi-progesterona, DHEA, Estrona (soro) Metanefrinas e Normetanefrinas (plasma e urina de 24h) <sup>a</sup>	<i>Radioimmunoassay</i> (RIA)
Ácido vanilmandélico (urina de 24h) <sup>a, b</sup>	Cromatografia de afinidade
5-hidroxiindolacético (urina de 24h) <sup>a, b</sup>	Cromatografia de troca iónica
ANA, ANCA, ASCA, dsDNA	Imunofluorescência Indireta (IFI) <i>Imunoblot</i> <sup>c</sup>
Proteinograma (soro)/Proteína de Bence-Jones (urina), Imunofixação (soro e urina), Eletroforese de Hemoglobina, separação das isoenzimas da Fosfatase Alcalina.	Eletroforese em gel de agarose <sup>d</sup>

<sup>a</sup> A urina de 24h deve ser colhida para um contentor com ácido clorídrico, de forma a impedir a degradação do analito.

<sup>b</sup> Leitura por espectrofotometria.

<sup>c</sup> Se o *screening* por IFI for positivo, prossegue-se para a deteção específica de autoanticorpos por *imunoblot*.

<sup>d</sup> Separação eletroforética, imunofixação (quando aplicável) e coloração do gel no *Hydrasys*.

As técnicas de RIA são técnicas competitivas, entre o analito que se pretende avaliar e um antígeno marcado com <sup>125</sup>I (radioativo). Após a execução da técnica, a quantificação é feita por leitura no contador de radiação  $\gamma$ , sendo a quantidade de analito inversamente proporcional ao sinal obtido.

As técnicas eletroforéticas são semiautomáticas, uma vez que as pipetagens das amostras (e, no caso das imunofixações, também dos anti-soros) é feita manualmente.

## 2.4. Microbiologia

Neste setor são recebidos e tratados diversos produtos. Em função da amostra, o processamento sofre ligeiras variações, sempre com o objetivo de identificar o microrganismo responsável pela infecção e realizar o teste de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA). O trabalho realizado neste setor depende grandemente da competência de técnicos especializados, já que a Microbiologia é a área menos automatizada das análises clínicas.

Apesar do fluxo diário de amostras ser bastante variável, o sangue e a urina são as amostras enviadas ao laboratório com maior frequência (4 a 6 por dia). Seguem-se as secreções respiratórias e os exsudatos (1 a 2 por dia). As restantes amostras são menos frequentes.

Durante o estágio tive a oportunidade de processar as diversas amostras recebidas no laboratório, de acordo com os métodos descritos de seguida.

### Sangue (Hemocultura)

O sangue é, em situações normais, um fluido estéril. Como tal, a presença de microrganismos na corrente sanguínea está associada a infecção grave, que pode mesmo levar à morte do indivíduo [27].

Assim, a hemocultura tem como objetivo a rápida deteção e identificação do microrganismo presente na corrente sanguínea.

O sangue para hemocultura deve ser colhido por punção venosa e através de cateter venoso central, quando presente. Antes da colheita, o local da punção deve ser cuidadosamente desinfetado com dois antissépticos diferentes. Este procedimento tem como objetivo reduzir ao máximo a contaminação da amostra de sangue com a flora comensal da pele [27,28].

Apesar do perigo que representam, quando presentes, os microrganismos existem no sangue em pequena quantidade. Assim, devem inocular-se pelo menos dois frascos de hemocultura com 8 a 10 ml de sangue cada, para aumentar a probabilidade de detetar o microrganismo presente.

Os frascos de hemocultura contêm um meio líquido de tripticase de soja, ao qual foram adicionadas resinas inativadoras de antibiótico, pelo que são igualmente úteis independentemente do doente já ter iniciado a antibioticoterapia. Este meio de cultura permite o crescimento da maior parte dos microrganismos: bactérias aeróbias estritas e facultativas, fungos leveduriformes e fungos filamentosos [29].

Depois de inoculados, os frascos de hemocultura são colocados no BD BACTEC™ 9050 *Blood Culture System*, um sistema que conjuga a incubação das amostras a 35°C, a sua agitação permanente e a detecção de crescimento bacteriano baseado em alterações de fluorescência.

O fundo do frasco de hemocultura possui uma membrana permeável a CO<sub>2</sub>. O crescimento bacteriano no interior do frasco de hemocultura resulta na produção deste gás, que difunde através da membrana e se dissolve no líquido que a rodeia, fazendo diminuir o seu pH. Esta acidificação provoca o aumento da fluorescência, sendo esta alteração detetada pelo BD BACTEC™ 9050 *Blood Culture System* [27].

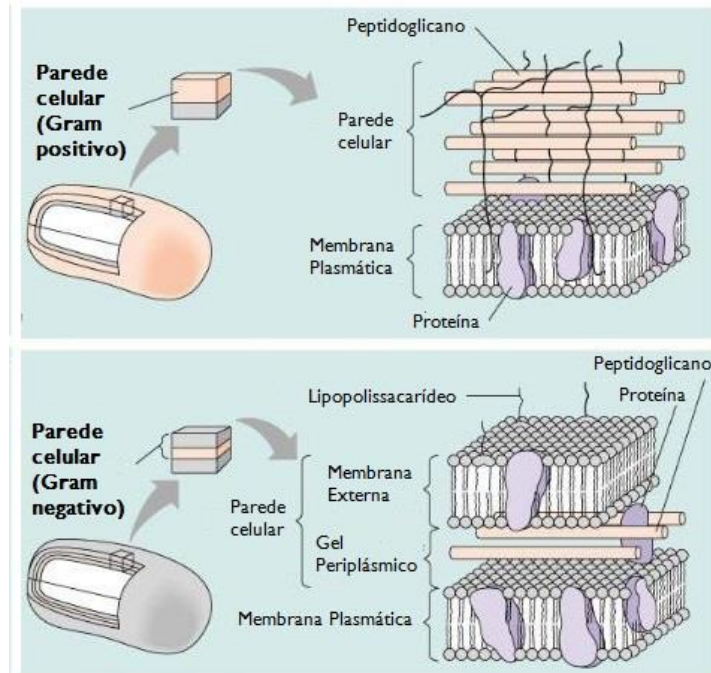
O crescimento de microrganismos é avaliado a cada 10 minutos. Este processo mantém-se por 7 dias para detecção de crescimento bacteriano e por 14 dias para detecção de crescimento de fungos. Após este período de tempo, se não houver crescimento de microrganismos, a amostra é dada como negativa.

Quando há detecção de crescimento bacteriano, o sistema indica que a hemocultura é positiva. Deve então preparar-se um esfregaço a partir da hemocultura, fixá-lo pela ação do calor (no bico de Bunsen) e proceder à coloração de Gram [30]. O método da coloração está descrito na Tabela IX.

**Tabela IX:** Técnica de coloração de Gram.

Etapa		Tempo
Corante 1	Cristal Violeta	30 segundos
Mordente	Soluto de Lugol	1 minuto
Diferenciador	Álcool-acetona	Gota-a-gota, até descorar
Lavar com água corrente		
Corante 2	Fucsina Ácida Diluída	30 segundos

Esta técnica diferencia bactérias de Gram positivo de bactérias de Gram negativo, com base na diferente constituição da parede celular (Figura 13). O cristal violeta penetra a parede bacteriana e, após adição do soluto de Lugol, forma um complexo com o iodo desta solução. Quando se aplica o diferenciador, os complexos formados ficam retidos no interior da espessa camada de peptidoglicano que constitui a parede celular das bactérias de Gram positivo, conferindo-lhes coloração roxa. No caso das bactérias de Gram negativo, devido à menor densidade da sua parede celular, os complexos de cristal violeta e iodo são removidos quando se aplica o diferenciador. O diferenciador promove ainda a permeabilização da membrana externa das bactérias de Gram negativo, o que facilita a sua descoloração. Estas bactérias adquirem uma coloração cor-de-rosa, que lhes é conferida pelo corante de contraste, a fucsina diluída [30].



**Figura 13:** Constituição da parede celular de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABrwUJAL/bacterias?part=2>

Os esfregaços corados pela técnica de Gram devem ser observados ao microscópio, na objetiva de 50x (imersão em óleo). Devem ser observadas a cor e a morfologia dos microrganismos, de forma a incluí-los numa de 4 subpopulações: bacilos de Gram negativo, bacilos de Gram positivo, cocos de Gram negativo, cocos de Gram positivo.

Caso se verifique a presença de fungos, estes devem também ser identificados (leveduras ou fungos filamentosos).

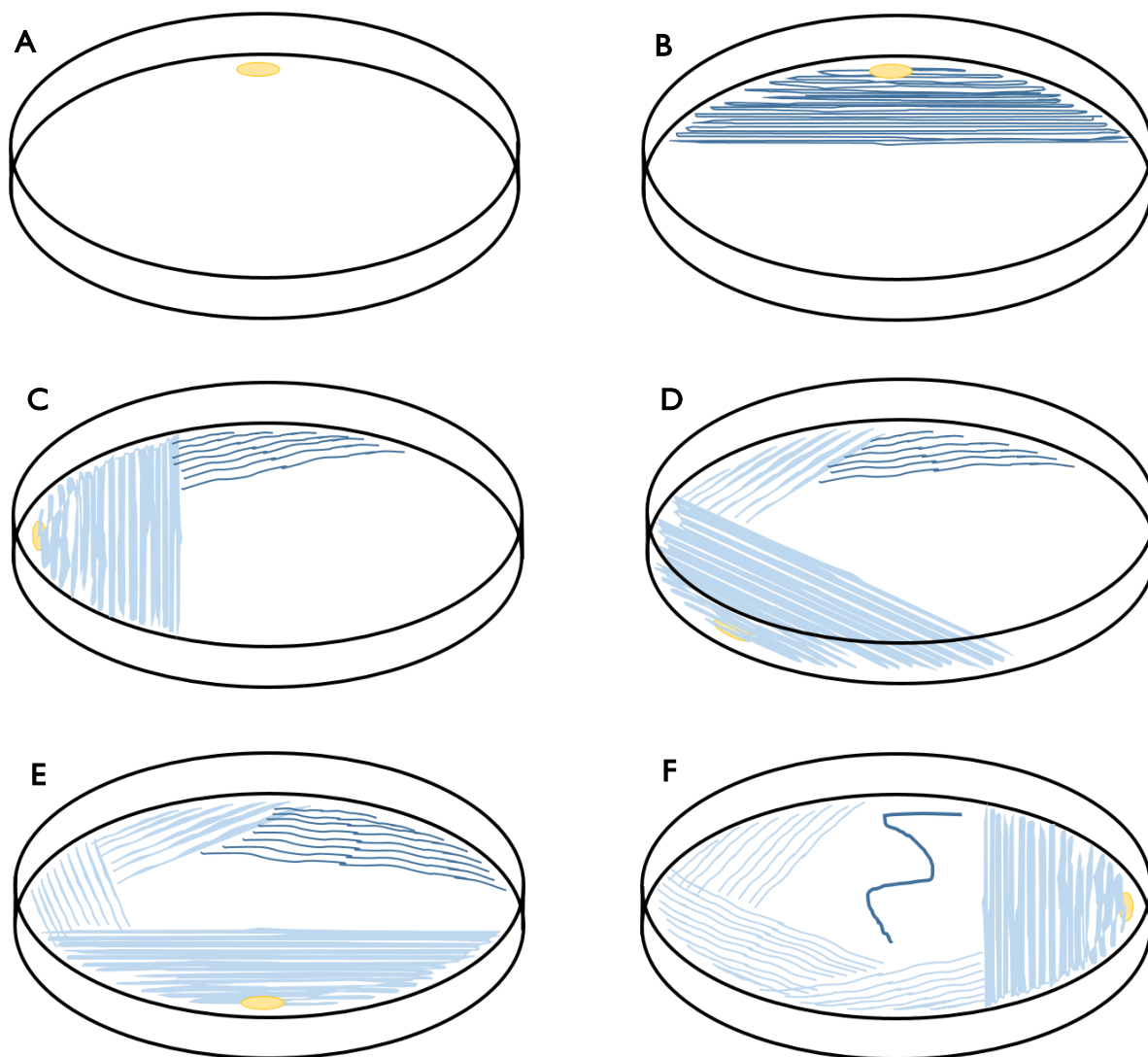
Paralelamente à coloração de Gram, as hemoculturas positivas devem ser repicadas para uma gelose de sangue e incubadas a 37°C, durante 24 a 48h. A amostra deve ser semeada pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido, conforme esquematizado na figura 14. Este passo deve ser efetuado independentemente de se observar flora na coloração de Gram.

A gelose de sangue utilizada (COS – gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro) é um meio enriquecido com peptonas que facilita o isolamento de microrganismos fastidiosos, bem como da maior parte dos microrganismos provenientes de amostras biológicas. Para além disso, pelo facto de ter sangue na sua constituição, permite a observação de hemólise, um aspeto importante na identificação bacteriana [31].

Caso não haja crescimento bacteriano na placa de COS, a hemocultura positiva deve então ser repicada para gelose Chocolate com *PolyViteX* (PVX), um meio de cultura enriquecido. Este é obtido a partir do aquecimento de sangue, provocando hemólise e consequente libertação de hemina (fator X, proveniente da hemoglobina). É ainda

suplementado de *PolyViteX*, que faculta NAD (fator V) ao meio de cultura. Estes fatores permitem o crescimento e isolamento de microrganismos fastidiosos que não crescem em COS. São exemplos *Neisseria* sp. e *Haemophilus* sp. [28,31].

Para além do sangue, os frascos de hemocultura podem ser inoculados com outros fluidos biológicos habitualmente estéreis, como líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, ou outros.



**Figura 14:** Esquema da técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido (de A para F).

De forma idêntica a uma hemocultura comum, é também possível detetar o crescimento de micobactérias no sangue. Neste caso, são utilizados frascos com caldo Middlebrook e *Brain-Heart Infusion* (BHI), que facilitam a recuperação e desenvolvimento das micobactérias. Estes meios de cultura permitem também o crescimento de leveduras e fungos filamentosos.

As hemoculturas para pesquisa de micobactérias são inoculadas com 1 a 5 ml de sangue e são mantidas em incubação durante 42 dias, tempo após o qual a amostra é dada como negativa caso não haja evidências de crescimento.

Quando uma hemocultura para pesquisa de micobactérias é dada como positiva, efetua-se um esfregaço para coloração de Kinyoun. Esta técnica, descrita na Tabela X, tem como objetivo a observação de *Mycobacterium* sp., *Cryptosporidium* sp. e *Isospora* sp..

Tabela X: Técnica de coloração de Kinyoun.

Etapa		Tempo
Corante 1	Carbolfucsina	4 minutos
Lavar com água corrente		
Descorante	Ácido-álcool	5 segundos
Lavar com água corrente		
Corante 2	Verde brilhante	30 segundos
Lavar com água corrente		

Recorre-se a esta coloração uma vez que as micobactérias possuem uma membrana externa constituída por ácidos micólicos (Figura 15), que as impermeabiliza aos corantes aquosos utilizados na coloração de Gram. Por outro lado, os corantes utilizados na coloração de Kinyoun têm grupos fenol, o que lhes permite transpor a membrana externa e a parede celular das micobactérias [32]. Devido a esta constituição específica e à sua morfologia (bacilos), as micobactérias são também designadas por bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). Este grupo inclui ainda *Nocardia* sp. e *Rhodococcus* sp..

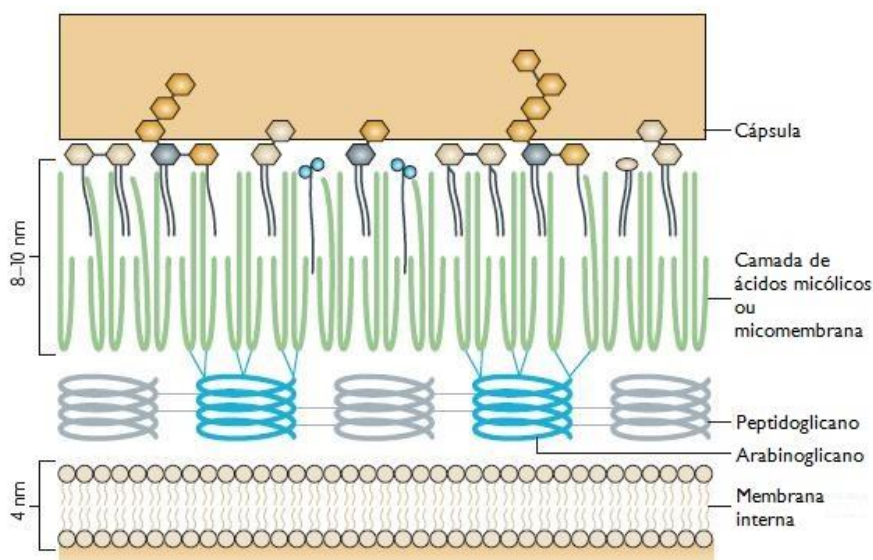


Figura 15: Constituição da parede celular e membrana externa dos bacilos ácido-álcool resistentes. Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAqGqcAH/aula-04-mycobacterium-ideal>

Os esfregaços corados pela técnica de Kinyoun devem ser observados ao microscópio, na objetiva de 50x (imersão em óleo). Os BAAR surgem com coloração vermelha, conferida pela carbolfucsina, uma vez que resistem à descoloração [32].



A hemocultura deve ainda ser repicada para meio sólido Lowenstein-Jensen. Este é um meio de cultura à base de batata, glicerol e ovo, que contém todos os nutrientes necessários ao crescimento de micobactérias. Tem também verde de malaquite, que lhe confere a sua cor característica e inibe o crescimento de outros microrganismos. Apesar de se destinar ao isolamento de micobactérias, este meio de cultura permite uma ótima recuperação de *M. tuberculosis* mas não de outras espécies do mesmo género [33].

O meio sólido Lowenstein-Jensen é um meio inclinado, comercializado em tubo. Após a sementeira, a incubação deve prolongar-se por 42 dias, com visualização semanal, e mantendo sempre a tampa do frasco desenroscada para permitir a entrada de oxigénio. Caso haja crescimento de colónias suspeitas (com aspeto de couve-flor), é efetuado um esfregaço e coloração de Kinyoun a partir de uma das colónias. Caso se confirme que a colónia observada é composta por BAAR o meio de cultura é devidamente acondicionado e enviado para o laboratório do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, para identificação.

## **Urina**

Tal como o sangue, a urina é um fluido estéril. No entanto, a uretra é colonizada por bactérias que são arrastadas aquando da micção. A uretra pode ser também uma porta de entrada para microrganismos patogénicos, levando a infeções do trato urinário. Estas são mais comuns em mulheres, devido ao menor tamanho da uretra, e em homens após os 60 anos de idade, devido ao aumento do tamanho da próstata [34].

Quando há suspeita de infeção urinária, é enviada ao laboratório uma amostra de urina, em contentor estéril. A amostra pode ser colhida de diversas formas: punção de cateter urinário, punção suprapúbica, drenagem de nefrostomia, saco coletor (em crianças) ou, idealmente, deve colher-se o jato médio da primeira urina da manhã [28].

O processamento de amostras de urina compreende, em geral, dois exames: a análise sumária de urina e a urocultura.

### **Urocultura:**

A urocultura permite a quantificação dos microrganismos presentes na urina, e é o primeiro passo efetuado após a chegada da amostra, de forma a evitar a sua contaminação. A urina é semeada em gelose CLED (Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos) e CNA (gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro, Colistina e Ácido Nalidíxico), conforme ilustrado na figura 16. Para tal, utiliza-se uma ansa calibrada de 10 µl. Devem incubar-se as placas a 35°C, durante 18 a 24h, e então fazer-se a leitura quantitativa, muito importante na distinção entre microrganismos colonizadores, contaminantes e infetantes [28,34].

O meio de cultura CLED é um meio não seletivo, usado na urocultura, pois permite o isolamento de microrganismos que infetam habitualmente o trato urinário. Devido à sua composição com lactose e azul de bromotimol (indicador de pH) permite diferenciar bactérias fermentadoras de lactose de bactérias não fermentadoras, através da variação da cor do meio de cultura. Assim, os microrganismos fermentadores de lactose formam colónias amarelas, tornando também amarelo o meio de cultura. Por outro lado, os microrganismos não fermentadores formam colónias verdes ou azuis, deixando o meio de cultura com a sua cor original. A deficiência em eletrólitos impede o “*swarming*” característico das colónias de *Proteus* sp., facilitando a quantificação deste microrganismo e impedindo que este contamine colónias de outros microrganismos [28,31].

A gelose CNA é uma gelose de sangue normal, suplementada com colistina e ácido nalidíxico. Estes antibióticos inibem o crescimento de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* sp., tornando o meio seletivo para bactérias de Gram positivo [31].

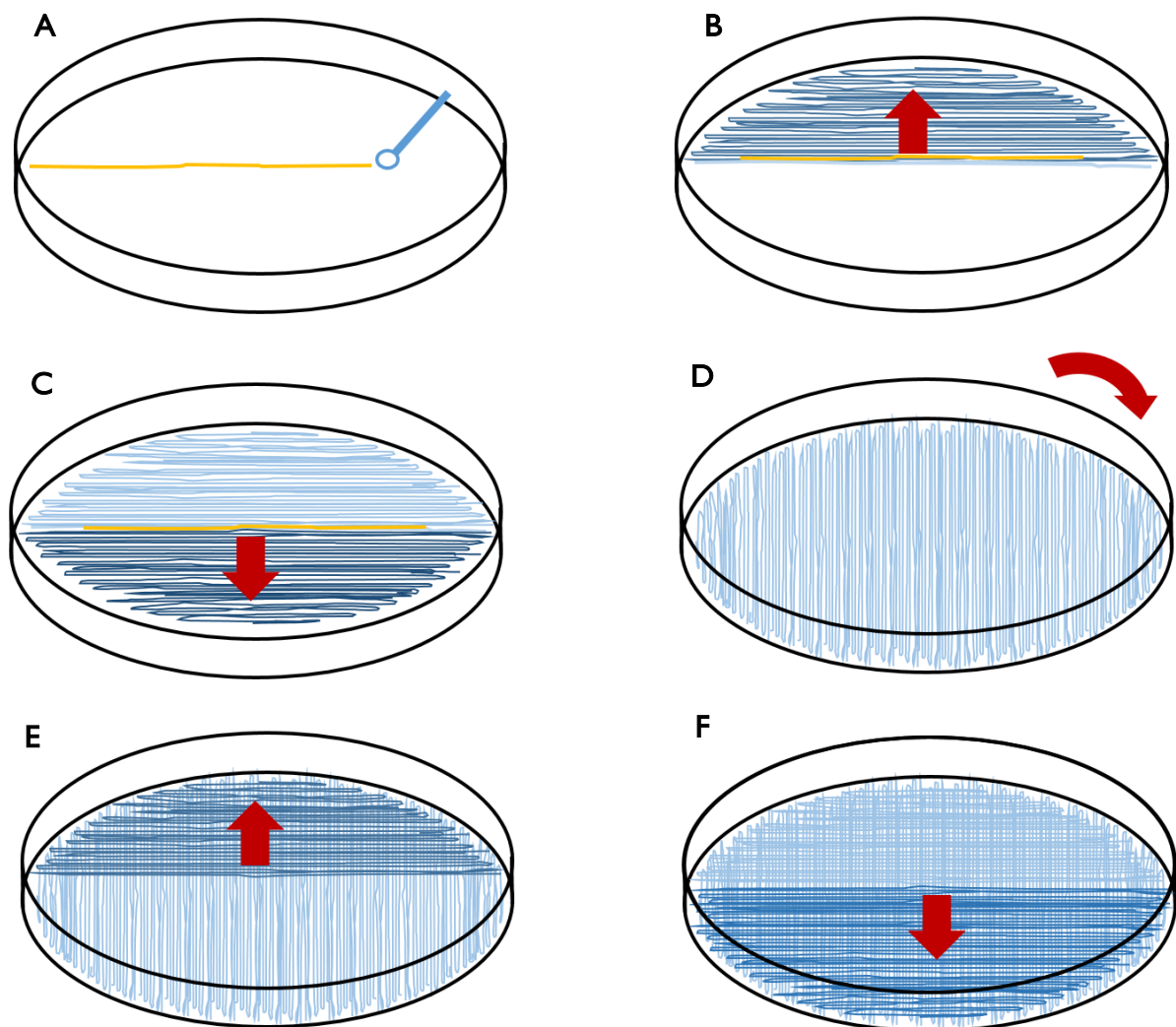


Figura 16: Esquema da técnica de sementeira de urina (de A para F).

Considera-se que a urocultura é positiva se existirem pelo menos  $10^5$  UFC (Unidades Formadoras de Colónias) por ml de urina. Ou seja, tendo em conta que a urocultura se efetuou com uma ansa de 10  $\mu$ l, devem crescer em cultura pelo menos 1000 colónias. Esta quantificação é sempre feita no CLED, dadas as características inibitórias do CNA.

Uma urocultura positiva continua em estudo para identificação do microrganismo e respetivo TSA, exceto se houver crescimento de 3 ou mais estirpes bacterianas. Neste caso, considera-se que houve contaminação da amostra, e a cultura é dada como polimicrobiana.

### Análise Sumária de Urina:

Esta análise compreende a avaliação semiquantitativa de determinados parâmetros bioquímicos na urina e a observação do sedimento urinário.

Parte da amostra de urina é colocada num tubo apropriado, e nela é mergulhada uma tira impregnada com reagentes que permitem a deteção de determinados parâmetros numa amostra de urina, através de reações químicas rápidas (Figura 17). Esta avaliação é realizada de forma automática no Cobas® u411, com base na cor adquirida pelos campos correspondentes às várias reações químicas e no aspeto macroscópico da amostra (cor e turvação).

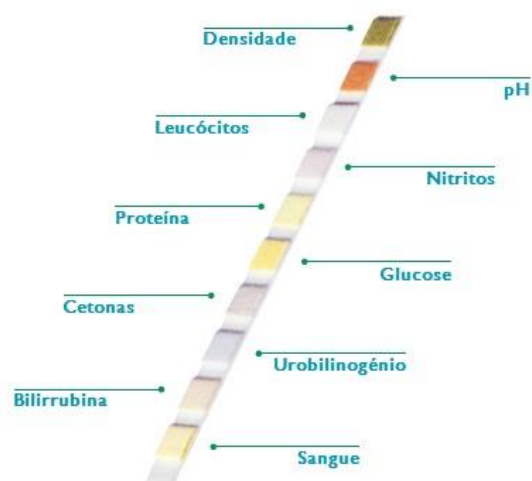
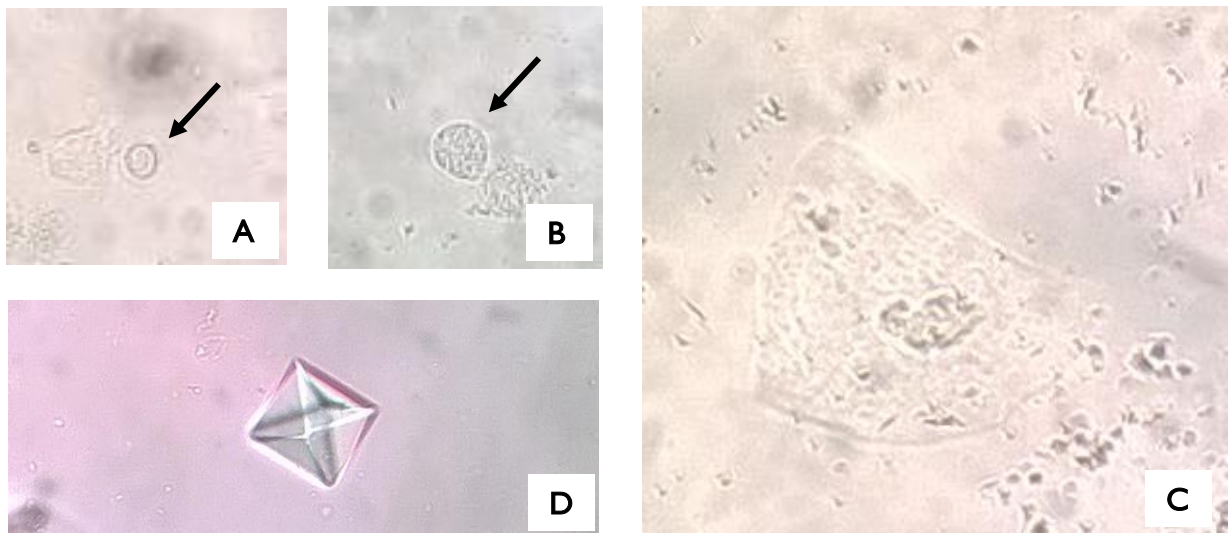


Figura 17: Tira Combur® 10 Test.

Adaptado de

<http://www.cobas.com/home/product/urinalysis-testing/combur-test-strip.html>

A análise do sedimento realiza-se após centrifugação da amostra de urina a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Uma pequena fração do sedimento é colocada entre lâmina e lamela e observada ao microscópio. Devem pesquisar-se GB, GV, células epiteliais, cilindros e cristais em pelo menos 10 campos diferentes, com a objetiva de 40x. Na figura 18 estão apresentadas as estruturas visualizadas com maior frequência no sedimento urinário.



**Figura 18:** Estruturas frequentemente observadas no sedimento urinário. Observação ao microscópio ótico com a objetiva de 40x. A: GV; B: GB; C: Célula Epitelial; D: Cristal de Oxalato de Cálcio. Fotos SPC-IPOC.

## Secreções Respiratórias

Quando há suspeita de infecção do trato respiratório inferior, o laboratório recebe, em contentor esterilizado, amostras de expetoração, lavados ou aspirados brônquicos. A amostra mais comum é a expetoração e, se possível, deve colher-se a primeira da manhã [28].

Em situações de suspeita de infecção por microrganismos comuns, prepara-se um esfregaço para coloração de Gram. Neste exame, devem ter-se em atenção dois aspetos:

### Relação entre leucócitos e células epiteliais (amostras de expetoração):

Devem observar-se pelo menos 10 campos, na objetiva de 10x. O objetivo é perceber se a amostra recebida é uma verdadeira expetoração ou se está contaminada com saliva. Esta decisão é baseada nos critérios de Murray-Washington, indicados na Tabela XI.

**Tabela XI:** Critérios de Murray-Washington para a avaliação da qualidade de amostras de expetoração.

	<b>Células epiteliais/campo</b>	<b>GB/campo</b>
GRUPO 1	25	10
GRUPO 2	25	10 – 25
GRUPO 3	25	25
GRUPO 4	10 – 25	25
GRUPO 5	<10	25

Consideram-se verdadeiras expetorações as amostras que se incluem nos grupos 4 e 5 da tabela acima. Caso se verifique que a amostra não é uma verdadeira expetoração, considera-se que ocorreu contaminação com secreções da orofaringe e não se valorizam os microrganismos isolados.

### **Avaliação da flora microbiana:**

Deve avaliar-se se existe predomínio de algum microrganismo, tendo em conta a morfologia (cocos, bacilos) e se são de Gram negativo ou de Gram positivo. Esta pesquisa deve ser feita com a objetiva de 50x (imersão em óleo). Caso haja algum predomínio considera-se que existe infeção provocada por esse agente. Se existirem vários tipos de microrganismos considera-se que a flora é polimicrobiana e não se valoriza o que crescer em cultura.

Paralelamente, procede-se à sementeira do produto em 3 meios de cultura distintos – COS, PVX e gelose Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC2) – pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido e incubação na estufa a 37°C, por 18 a 24h.

A gelose SGC2 é um meio de cultura seletivo, usado para isolamento de fungos leveduriformes e/ou filamentosos. Parte da seletividade é-lhe conferida pela constituição em peptonas e dextrose e pelo pH ligeiramente ácido. O crescimento bacteriano é inibido pelos antibióticos adicionados: a gentamicina inibe igualmente o crescimento de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, enquanto o cloranfenicol inibe espécies bacterianas que possam resistir à gentamicina [31].

Muitas vezes, chegam ao laboratório amostras de secreções respiratórias para pesquisa de BAAR em doentes com suspeita de tuberculose. Nestes casos, devem ser colhidas 3 amostras de expetoração, em dias diferentes, já que a emissão de micobactérias não é constante e a probabilidade de deteção é muito baixa. A partir destas amostras, deve efetuar-se uma coloração de Kinyoun.

Os BAAR existem em muito baixa quantidade na amostra e, para além disso, esta está contaminada com muco e com microrganismos comensais da orofaringe. Assim, antes da sementeira, a amostra sofre um processo de descontaminação, liquefação, concentração e homogeneização [33]. Para este efeito, é utilizado o *kit* BD BBL MycoPrep:

### **Descontaminação e liquefação:**

O reagente principal é uma solução de NaOH, N-acetil-L-cisteína e citrato de sódio. Devido ao seu elevado potencial tóxico, o NaOH é utilizado como descontaminante, inativando a flora comensal. É também um agente mucolítico, emulsificando a amostra. A N-acetil-L-cisteína é também um agente mucolítico. É utilizado para diminuir o tempo de atuação do NaOH, impedindo a sua ação sobre os BAAR e facilitando a sua recuperação. O citrato de sódio é utilizado para ligar iões que existam na amostra e possam inativar a N-acetil-L-cisteína.

É, depois, adicionado tampão fosfato, que diminui a atividade da mistura anterior, estabilizando a amostra.

#### **Concentração e Homogeneização:**

A amostra é centrifugada a 3000 r.p.m. durante 20 minutos. Caso existam BAAR na amostra, eles ficarão concentrados no sedimento [33].

A partir da amostra homogeneizada efetua-se um esfregaço para coloração de Kinyoun e uma sementeira em meio Lowenstein-Jensen. A partir daqui, todo o processo decorre como indicado nas hemoculturas positivas para a pesquisa de BAAR.

### **Exsudatos Purulentos e Outros Líquidos**

Neste tipo de amostras incluem-se exsudatos, pús, líquido pleural e líquido ascítico. Estas amostras devem ser transportadas para o laboratório em recipiente esterilizado: contentor, seringa ou zaragatoa, dependendo do tipo de lesão. No caso de lesões abertas, o exsudato deve ser colhido com zaragatoa e enviado ao laboratório em meio de transporte de Stuart ou Amies. Estes meios de transporte preservam a flora bacteriana da amostra, permitindo a sua recuperação e cultura. Caso se trate de uma lesão fechada, a colheita deve ser feita por punção com seringa, podendo enviar-se desta forma ao laboratório. Nestes casos, deve sempre suspeitar-se de infeção por agentes anaeróbios, e processar a amostra em conformidade [28].

O processamento deste tipo de amostras compreende sempre a visualização de um esfregaço corado pela técnica de Gram e a sementeira, pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido, em COS, PVX e SGC2. As placas são incubadas a 37°C, por 18 a 24h.

Caso a pesquisa de BAAR seja requisitada pelo médico, efetua-se um esfregaço para coloração de Kinyoun e semeia-se o produto em meio de cultura Lowenstein-Jensen. Todo o processo se desenrola como indicado anteriormente.

Quando se suspeita de infeção por microrganismos anaeróbios, a amostra é semeada em meio líquido Schaedler, um meio de enriquecimento para bactérias anaeróbias estritas ou facultativas. Esta propriedade deve-se à sua composição em fatores de crescimento: extrato de levedura, hemina, vitamina K3, dextrose e L-cistina [31]. O meio é incubado a 37°C, por 18 a 24h. Paralelamente, a amostra é semeada em gelose Schaedler com 5% de sangue de carneiro (SCS). O meio SCS tem uma composição idêntica à do meio líquido Schaedler e é utilizado para o mesmo fim. A sementeira é feita em duas placas diferentes, uma incubada em

aerobiose e outra em anaerobiose. A incubação efetua-se a 37°C, por 24 a 48h. Posteriormente, compara-se o crescimento bacteriano nas duas placas.

O crescimento bacteriano em meio líquido provoca a turvação do mesmo pelo que, quando se verifica, procede-se à preparação de um esfregaço para coloração de Gram e repicagem para um meio sólido adequado. Pode, então, repicar-se o meio líquido para COS, colocado em CO<sub>2</sub>, ou SCS, incubado em aerobiose e em anaerobiose.

As atmosferas seletivas são obtidas com a utilização do sistema *GENbag*, que acopla uma bolsa de plástico e um gerador adequado à atmosfera que se pretende (anaeróbia, microaerofílica ou com elevada concentração de CO<sub>2</sub>).

### **Exsudatos Vaginais**

O processamento de exsudatos vaginais é idêntico ao descrito para outros exsudatos, mas compreende outras etapas.

#### **Exame direto a fresco:**

Numa lâmina, coloca-se uma gota de NaCl (0,9%), onde se mistura um pouco da amostra. Observa-se ao microscópio, na objetiva de 40x, entre lâmina e lamela. Devem pesquisar-se fungos e *Trichomonas vaginalis*.

#### **Coloração de Gram:**

Para além da caracterização da flora bacteriana, devem procurar-se leucócitos e *clue cells*. Estas estruturas são células epiteliais revestidas de cocobacilos de Gram variável, características de infeção por *Gardenerella vaginalis* ou *Mobilluncus* sp. Estas bactérias não crescem em meios de cultura convencionais, e a observação de *clue cells* é suficiente para identificar o agente da infeção [35].

### **Gânglios e Biópsias**

Estas amostras são previamente maceradas e, geralmente, colocadas em meio líquido BHI. Este é um meio de enriquecimento que facilita o crescimento de todos os microrganismos. É constituído por extrato de cérebro e coração e adicionado de peptonas, fosfato e dextrose, que fornecem aos microrganismos todos os nutrientes de que necessitam. O meio é incubado a 37°C, por 18 a 24h. Se houver crescimento bacteriano, o meio fica turvo. Efetua-se então um esfregaço para coloração de Gram e o meio é repicado para COS.

## Pontas de Cateter

Em doentes com cateter venoso central e bacteriemia comprovada por hemoculturas positivas, o foco mais provável da infeção é o cateter. Assim sendo, o cateter deve ser removido e enviado ao laboratório, onde se tenta averiguar se este é ou não o foco da infeção.

A ponta do cateter é rodada em COS com uma pinça esterilizada, de acordo com o método de Maki. A placa é incubada a 37°C, por 18 a 24h. Isto permite averiguar a presença de microrganismos na superfície exterior do cateter, sendo que a cultura é considerada positiva se houver crescimento de pelo menos 15 colónias por cada 5 cm de cateter [28].

Posteriormente, a ponta do cateter é colocada em meio líquido Schaedler. Deste modo, promove-se o crescimento dos microrganismos que possam existir no exterior do cateter, mas também dos que possam estar no seu interior, podendo disseminar-se no sangue e causar bacteriemia. O meio é incubado a 37°C, por 18 a 24h e, se houver crescimento, é repicado para COS em CO<sub>2</sub>.

Por comparação entre as culturas obtidas a partir do rodado e do meio líquido Schaedler, é possível concluir se os microrganismos existentes no interior do cateter são os mesmos que existem no seu exterior, e averiguar se realmente são causadores de infeção sistémica.

## Fezes

Normalmente, apenas é realizado o exame bacteriológico de fezes, que consiste na pesquisa de *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Campylobacter* sp.. Se requisitado pelo clínico, pesquisa-se a presença de *Clostridium difficile*. Pode ainda fazer-se exame parasitológico e pesquisa de BAAR. As fezes são transportadas ao laboratório em contentor esterilizado e, idealmente, devem ser colhidas 3 amostras em dias consecutivos.

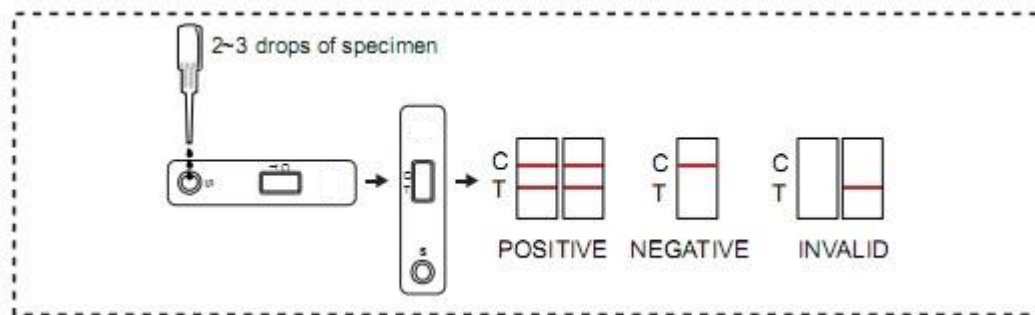
### **Pesquisa de *Clostridium difficile*:**

Este exame deve ser feito apenas quando requisitado pelo médico e em fezes diarreicas. Compreende duas etapas:

#### **Pesquisa da Glutamato Desidrogenase (GDH):**

Por imunocromatografia, pesquisa-se a enzima GDH específica de *Clostridium difficile*. É utilizado o kit RIDA<sup>®</sup> Quick *Clostridium difficile* GDH. A amostra é previamente incubada com reagentes que possuem anticorpos específicos contra a GDH de *Clostridium difficile*. A cassette é inoculada e, após 15 minutos, é lida e interpretada.





**Figura 19:** Esquema da cassette utilizada na pesquisa da Glutamato Desidrogenase específica de *Clostridium difficile*. Adaptado de [http://us01.i.aliimg.com/img/pb/826/272/108/1108272826\\_396.jpg](http://us01.i.aliimg.com/img/pb/826/272/108/1108272826_396.jpg)

A cassette utilizada, esquematizada na figura 19, possui duas zonas com anticorpos fixos marcados, a zona T e a zona C. Na zona T existem anticorpos anti-GDH, que ligarão a enzima caso ela esteja presente na amostra. Na zona C existem anticorpos contra o anticorpo anti-GDH presente nos reagentes. O teste é considerado positivo se ambas as zonas (T e C) apresentarem uma banda colorida aquando da leitura da cassette. É considerado negativo se apenas a zona C apresentar uma banda. No caso de não se visualizar nenhuma banda na zona C, o teste é considerado inválido, independentemente do que se verificar na zona T [36].

#### **Pesquisa da toxina B de *Clostridium difficile*:**

A positividade do teste imunocromatográfico deve ser confirmada por uma reação de polimerização em cadeia no *GeneXpert*<sup>®</sup>. Este teste pesquisa a presença das toxinas B e binária de *Clostridium difficile* e, se for positivo, significa que a estirpe detetada por imunocromatografia é produtora de uma das toxinas. Se for negativo, indica que, apesar de existir *Clostridium difficile* na amostra de fezes, este não produz nenhuma das toxinas, pelo que não é patogénico.

#### **Pesquisa de *Campylobacter* sp.:**

À semelhança do efetuado para a pesquisa de *Clostridium difficile*, a pesquisa de *Campylobacter* sp. também compreende duas etapas.

#### **Pesquisa de antígenos de *Campylobacter* sp.:**

Para este efeito, utiliza-se o *kit* RIDA<sup>®</sup> *Quick Campylobacter*, um teste imunocromatográfico de funcionamento idêntico ao utilizado na pesquisa da GDH de *Clostridium difficile*.

A amostra é previamente incubada com reagentes que possuem anticorpos específicos contra *Campylobacter*. Os antígenos bacterianos são detetados na zona T da cassette, enquanto na zona C se detetam os anticorpos presentes nos reagentes. A interpretação é também idêntica à descrita acima.

### **Exame cultural:**

No caso do teste imunocromatográfico ser positivo, prossegue-se para a coprocultura em gelose Campyloset (CAM). Este é um meio seletivo para espécies de *Campylobacter* habitualmente patogénicas, a partir de amostras de fezes. Possui sangue de carneiro, agentes redutores, antibióticos e antifúngicos, que permitem não só a recuperação das espécies de *Campylobacter* como também a inibição de outras bactérias ou fungos [31].

A gelose CAM é inoculada pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido e incubada a 37°C, por 18 a 24h, em atmosfera microaerófila.

### **Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp.:**

A presença destes dois microrganismos é avaliada em paralelo. Quando chega ao laboratório, a amostra de fezes é cultivada em gelose Hektoen e em caldo Selenito. A incubação é feita a 37°C, por 18 a 24h para o meio Hektoen, por 6 a 12h no caso do caldo Selenito.

O meio Hektoen permite o isolamento seletivo de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp.. A presença de sais biliares retarda o crescimento de enterobactérias e inibe bactérias de Gram positivo. Por outro lado, possui lactose e fucsina ácida com azul de timol (indicador de pH), permitindo a diferenciação entre bactérias fermentadoras (colónias de cor amarela) e não fermentadoras (colónias verdes ou azuis). Tanto *Salmonella* sp. como *Shigella* sp. não são fermentadoras de lactose. Permite ainda avaliar a formação de H<sub>2</sub>S, uma vez que as bactérias produtoras deste gás formam colónias de centro negro. *Salmonella* sp. é produtora de H<sub>2</sub>S, ao contrário de *Shigella* sp. [31,37].

O caldo Selenito é um meio de enriquecimento eletivo para *Salmonella* sp. pois possui sódio, que é tóxico para a maioria das enterobactérias e para algumas espécies de *Shigella*. No entanto, a sua seletividade apenas se verifica durante 6 a 12h, pelo que o caldo deve ser repicado para gelose Hektoen ao fim deste tempo [28].

### **LCR**

O LCR é um líquido estéril e, como explicado anteriormente, poderia ser inoculado em frascos de hemocultura e assim ser feito o exame microbiológico. No entanto, não é esse o procedimento habitual, uma vez que é colhido um volume muito pequeno de amostra.

O LCR é colhido para um recipiente estéril e transportado rapidamente ao laboratório. Assim que chega, é processado de imediato. É semeado em COS, PVX e SGC2, colocando-se três gotas em cada um dos meios de cultura, com uma pipeta esterilizada. Esta técnica está esquematizada na figura 20. Deve incubar-se a 37°C, por 18 a 24h.

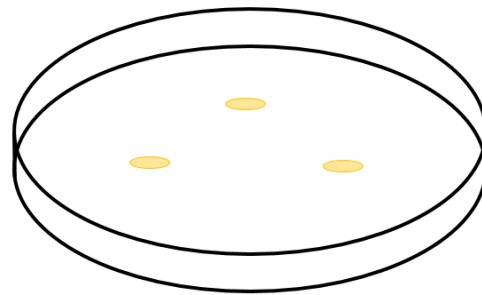


Figura 20: Esquema da técnica de sementeira de amostras de LCR.

É também colocada uma gota numa lâmina, para posterior coloração de Gram. Se houver suspeitas de infeção por *Cryptococcus neoformans* deve ainda fazer-se uma coloração com tinta-da-China.

### Exame Micológico para pesquisa de Dermatófitos

Apesar de ser pouco frequente, por vezes são enviadas ao laboratório amostras para pesquisa de fungos, tais como raspados de pele ou unhas. Nestes casos, deve ser efetuado um exame direto com KOH, entre lâmina e lamela. Deve visualizar-se ao microscópio na objetiva de 40x e procurar-se estruturas fúngicas (hifas, por exemplo).

A amostra é ainda semeada no sistema Mycoline, composto por uma lâmina com dois meios de cultura distintos (um de cada lado da lâmina) inserida num tubo. De um dos lados da lâmina, o meio de cultura é SGC2. Do outro lado da lâmina o meio de cultura é gelose Sabouraud com Cloranfenicol e Actidiona. As propriedades inibitórias deste meio de cultura são semelhantes às da gelose SGC2, com a inibição adicional da Actidiona, que impede o crescimento de algumas leveduras e fungos filamentosos. Este meio possui ainda vermelho de fenol como indicador de pH, que permite a deteção do crescimento de dermatófitos através da alteração da cor do meio provocada pela alcalinização decorrente do crescimento fúngico.

Se existir crescimento de fungos filamentosos, deve recorrer-se à técnica da fita-cola e observação por contraste com azul de lactofenol. Deve observar-se ao microscópio da mesma forma que o exame direto e devem analisar-se as características das estruturas fúngicas: tipo de hifas (septadas ou asseptadas), tipo de conidiogénese (macro ou microconídeos), forma dos conídios, entre outras. O aspeto macroscópico do fungo (frente e reverso), a temperatura e o tempo de crescimento também são características importantes. Todas estas informações devem ser tidas em conta na identificação do fungo.

Caso ocorra crescimento de fungos leveduriformes, deve efetuar-se um esfregaço para coloração de Gram. A identificação é feita de modo automático, como será descrito à frente.

## Identificação de Microrganismos e TSA

Após sementeira das amostras e incubação dos meios de cultura, os microrganismos isolados têm de ser identificados e submetidos a Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA). Estas duas etapas são feitas paralelamente e de forma automática no Vitek® 2. No entanto, estes testes automáticos dependem em grande parte de procedimentos manuais, que ajudam a traçar uma linha orientadora para a correta identificação do microrganismo.

### Identificação

A identificação dos microrganismos começa com a observação das colónias desenvolvidas nos meios de cultura. Muitos microrganismos têm aspetos muito característicos, e é possível fazer-se uma identificação preliminar presuntiva. Outros, têm uma identificação mais complicada, pelo que é necessário analisar bem o aspeto das colónias (cor, forma, tamanho, presença de muco), o seu odor, o tipo de hemólise e realizar nova coloração de Gram e algumas provas bioquímicas.

**Tipo de Hemólise:** diferentes bactérias têm diferente capacidade de lisar os GV e, portanto, apresentam características diferentes em gelose de sangue. Na figura 21 estão representados os diferentes tipos de hemólise.

- **microrganismos  $\beta$ -hemolíticos:** fazem hemólise total e apresentam um halo incolor em redor das colónias;

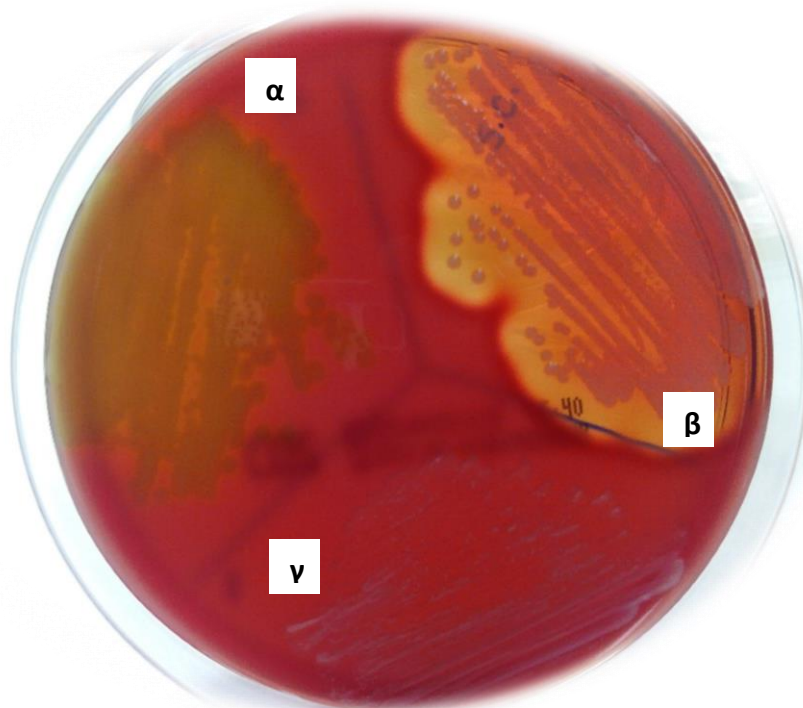
- **microrganismos  $\alpha$ -hemolíticos:** fazem hemólise parcial e apresentam um halo esverdeado em redor das colónias;

- **microrganismos  $\gamma$ -hemolíticos:** não hemolíticos, sem halo em volta das colónias.

**Nova coloração de Gram:** se houver dúvida acerca da morfologia bacteriana, deve efetuar-se uma coloração de Gram dos microrganismos desenvolvidos em cultura.

**Teste da Oxidase (Método de Kovac):** este teste permite detetar a presença da enzima citocromo oxidase, que participa no transporte de eletrões. É utilizado para diferenciar enterobactérias (oxidase negativa) de outros bacilos de Gram negativo (oxidase positiva) [38]. Numa lâmina, deve verter-se uma gota de água destilada estéril, onde se coloca um disco impregnado em tetrametil-p-fenilenodiamina. Com uma ansa, retira-se uma colónia bacteriana, que se coloca em cima do disco. Se este mudar de cor (para púrpura), considera-se que o microrganismo é oxidase positiva [38].

A mudança de cor do disco deve-se à oxidação do reagente pela citocromo oxidase bacteriana. Por este motivo, a leitura do teste deve ser imediata, já que o oxigénio atmosférico também tem a capacidade de oxidar a tetrametil-p-fenilenodiamina, produzindo falsos positivos. Não devem ser utilizadas ansas de metal.



**Figura 21:** Diferentes tipos de hemólise.  $\beta$ -hemólise: *Staphylococcus aureus*;  $\alpha$ -hemólise: *Streptococcus pneumoniae*;  $\gamma$ -hemólise: *Enterococcus faecalis*. Fotos SPC-IPOC.

**Teste da catalase:** permite detetar a presença da enzima catalase. É utilizado para distinguir *Staphylococcus* sp. (catalase positiva) de *Streptococcus* sp. (catalase negativa) [38]. Numa lâmina, deve colocar-se uma gota de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), à qual se junta uma colónia bacteriana. Esta enzima catalisa a degradação do  $H_2O_2$  a água e oxigénio. Assim, se o microrganismo possuir catalase, o oxigénio obtido da degradação do  $H_2O_2$  vai libertar-se, provocando efervescência. Quando se verifica esta efervescência, considera-se o teste positivo [38]. Esta prova não deve ser efetuada a partir de colónias bacterianas desenvolvidas em gelose de sangue, uma vez que os GV possuem peroxidase no seu interior, podendo originar falsos positivos.

**Teste da coagulase:** este teste avalia a presença da enzima coagulase. É utilizado para distinguir *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) de outras espécies do mesmo género (coagulase negativa) [38].

Utiliza-se uma pequena fração de plasma, que é inoculado com algumas colónias bacterianas. Incuba-se a  $37^\circ C$ , durante 4h, e verifica-se se ocorreu coagulação do plasma. Caso se verifique, o teste é positivo [38].

**Teste da Urease (Método de Christensen):** esta prova deteta a presença de urease. É usada para diferenciar *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. (urease negativa) das restantes bactérias fermentadoras de lactose (urease positiva) que possam crescer em meio Hektoen (coproculturas).

É utilizado um meio com ureia, inoculado com algumas colónias suspeitas. Segue-se a incubação a 37°C, durante 18 a 24h. Se a urease estiver presente, degradará a ureia existente no meio, gerando amónia. Há alcalinização do meio e alteração da cor de amarelo para carmim. Tanto *Salmonella* sp. como *Shigella* sp. são urease negativa, pelo que a positividade desta prova desvaloriza a flora desenvolvida em cultura [38].

**Teste da Suscetibilidade à Optoquina:** esta prova avalia a sensibilidade dos microrganismos à atividade da optoquina. É usado na distinção entre *Streptococcus pneumoniae* (sensível) e outras espécies de *Streptococcus* (resistentes) [38].

Para a realização deste teste é necessário preparar uma suspensão de densidade 0,5 MacFarland a partir do microrganismo que se pretende identificar. Pela técnica de sementeira em toalha, inocula-se um meio de cultura apropriado ao crescimento de *Streptococcus* sp. com esta suspensão. Com o auxílio de uma pinça esterilizada, coloca-se no centro da placa um disco de optoquina e incuba-se a 37°C, durante 18 a 24h, em CO<sub>2</sub>. Após a incubação, a presença de um halo sem crescimento bacteriano em volta do disco de antibiótico identifica o microrganismo como *Streptococcus pneumoniae* [38].

**Teste da Suscetibilidade à Bacitracina:** esta prova avalia a sensibilidade dos microrganismos à bacitracina. É usado na distinção entre *Streptococcus pyogenes* (sensível) e outras espécies de *Streptococcus* β-hemolíticos (resistentes) [38].

A técnica é em tudo semelhante à descrita para o teste de suscetibilidade à optoquina. Neste caso, utiliza-se um disco de bacitracina. Um teste de suscetibilidade positivo constitui uma identificação presuntiva de *Streptococcus pyogenes*.

**Teste da Suscetibilidade ao Metronidazol:** esta prova avalia a sensibilidade dos microrganismos ao metronidazol. É utilizado para diferenciar bactérias anaeróbias (sensíveis) de bactérias aeróbias (resistentes), quando se duvida da aerotolerância do microrganismo a identificar.

A técnica é idêntica às descritas para os testes de suscetibilidade anteriores. No entanto, a prova é efetuada em meio SCS e a incubação em anaerobiose, a 37°C, durante 24 a 48h. A

presença de um halo sem crescimento bacteriano em redor do disco de metronidazol indica que o microrganismo é anaeróbio.

Com base nestas características, seleciona-se uma de 5 cartas de identificação automática:

- GN, para bacilos de Gram negativo;
- GP, para cocos de Gram positivo;
- NH, para *Neisseria* sp., *Haemophilus* sp. e bacilos de Gram negativo fastidiosos;
- ANC, para anaeróbios, *Corynebacterium* sp. e outros bacilos de Gram positivo;
- YST, para fungos leveduriformes.

Prepara-se então uma suspensão a partir das colónias do microrganismo que se quer identificar, em 3ml de solução salina. A densidade dessa suspensão depende da carta a utilizar e as culturas devem ter, no máximo, 48h. A Tabela XII relaciona as cartas de identificação com a densidade (escala de MacFarland) da respetiva suspensão.

Em cada suspensão preparada, é aplicada a carta de identificação respetiva e a identificação decorre de forma automática no Vitek® 2.

### **Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos**

É também com base nas características dos microrganismos desenvolvidos em cultura que se selecionam as cartas de TSA. Existem várias cartas, mas apenas 6 se utilizam no SPC do IPOC:

- AST-NI 92, para bacilos de Gram negativo (*Enterobacteriaceae*);
- AST-N222, para bacilos de Gram negativo não fermentadores (oxidase positiva);
- AST-P619, para *Staphylococcus* sp.;
- AST-P586, para *Enterococcus* sp.;
- AST-PST01, para *Streptococcus* sp.
- AST-YS07, para fungos leveduriformes.

A partir da suspensão preparada para a identificação do microrganismo no Vitek® 2, pipeta-se um determinado volume para realizar o TSA. O volume depende do tipo de carta de identificação, e é apresentado na Tabela XII.

**Tabela XII:** Densidade das suspensões preparadas para identificação de microrganismos e volume necessário para o TSA, em função da carta utilizada.

Carta de Identificação	Densidade	Volume a pipetar para TSA
GN	0.60 – 0.63 MacFarland	145 µl
GP	0.60 – 0.63 MacFarland	280 µl
YST	1.80 – 2.20 MacFarland	280 µl
ANC	2.70 – 3.30 MacFarland	
NH	2.70 – 3.30 MacFarland	

A suspensão obtida para o TSA também deve ter 3ml de volume. Deve ser bem homogeneizada com uma pipeta de Pasteur esterilizada e deve utilizar-se uma gota dessa suspensão para fazer o controlo da identificação do microrganismo (também designado por controlo ID). A gota é então semeada em COS (para identificação de bactérias de Gram positivo), CLED (para identificação de bactérias de Gram negativo) ou SGC2 (para identificação de leveduras). O controlo ID tem como objetivo avaliar a pureza da suspensão preparada para identificação do microrganismo.

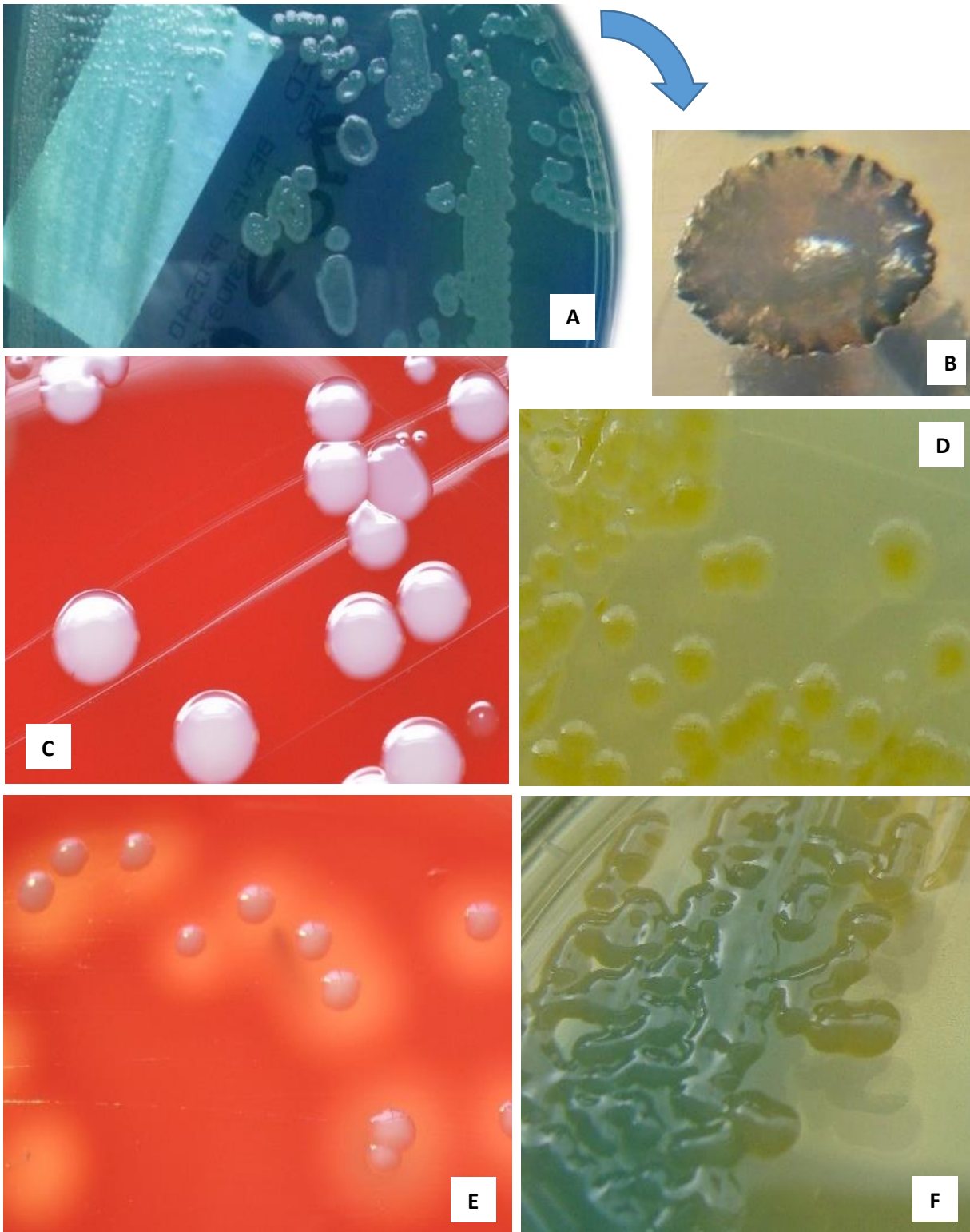
Não existe TSA automático para microrganismos identificados com as cartas NH e ANC. O controlo ID destes microrganismos é efetuado a partir da suspensão preparada para identificação dos mesmos, em PVX caso se utilize uma carta NH, ou SCS incubado em anaerobiose, caso se utilize a carta ANC.

Após identificação e realização do TSA para os diferentes microrganismos, o analisador Vitek<sup>®</sup> 2 indica a espécie a que pertence o microrganismo, bem como se ele é sensível ou resistente aos diferentes antibióticos testados. Os microrganismos isolados com maior frequência de amostras biológicas são apresentados na figura 22.

Os TSA obtidos pelo sistema Vitek<sup>®</sup> 2 estão de acordo com as normas EUCAST. No caso de haver alguma dúvida quanto aos resultados apresentados, podem sempre realizar-se testes de suscetibilidade baseados na técnica de difusão em disco ou por E-test. Para este efeito é utilizada gelose Mueller-Hinton (MHE), um meio de cultura especialmente desenvolvido para o efeito e em conformidade com as normas EUCAST e CLSI. Permite o crescimento de todos os microrganismos não fastidiosos, com o mínimo de interferências por parte dos constituintes [31].

Pode também utilizar-se gelose Mueller-Hinton com 5% de sangue de cavalo e NAD (MHF), um meio com as mesmas propriedades do MHE, mas com constituintes que permitem o crescimento de microrganismos fastidiosos [31]. Estes testes de suscetibilidade são efetuados de forma idêntica ao que foi descrito anteriormente.





**Figura 22:** Microrganismos frequentemente isolados de amostras biológicas. A – *Pseudomonas aeruginosa* em CLED, microrganismo isolado de hemocultura; B – *Pseudomonas aeruginosa*, detalhe de uma colônia; C – *Staphylococcus epidermidis* em COS, microrganismo isolado de hemocultura; D – *Escherichia coli* em CLED, microrganismo isolado de urocultura; E – *Staphylococcus aureus* em COS, microrganismo isolado de urocultura. F – *Klebsiella pneumoniae* em CLED, microrganismo isolado de urocultura.

Adaptados de: A – [http://www.microregistrar.com/wp-content/gallery-bank/gallery-uploads/o\\_18vivp89iv111joflthemd96iq.jpg](http://www.microregistrar.com/wp-content/gallery-bank/gallery-uploads/o_18vivp89iv111joflthemd96iq.jpg).

B – <http://www.bacteriainphotos.com/photo%20gallery/pseudomonas%20and%20staphylococcus.jpg>.

C – [http://www.bacteriainphotos.com/staphylococcus\\_epidermidis\\_on\\_blood\\_agar.html](http://www.bacteriainphotos.com/staphylococcus_epidermidis_on_blood_agar.html).

D – <https://www.flickr.com/photos/nathanreading/6141287175/>.

E – <https://www.flickr.com/photos/nathanreading/5867402600/>.

F – <https://www.flickr.com/photos/nathanreading/6142505941>.

## 2.5. Controlo de Qualidade

De forma a garantir que os resultados obtidos no laboratório são fiáveis, realizam-se periodicamente dois tipos de controlo de qualidade.

### Controlo de qualidade interno

Tem o objetivo de avaliar a precisão dos resultados laboratoriais obtidos. É realizado todas as manhãs, para todos os parâmetros determinados automaticamente, exceto no setor da Microbiologia.

O material de controlo pode ser adquirido no estado líquido ou liofilizado, sendo, neste último caso, hidratado 1h antes da sua utilização. Este material possui uma concentração conhecida dos componentes habitualmente quantificados, e é colocado em cada aparelho no início de cada dia, antes de se processarem as amostras dos pacientes. Os resultados são analisados num gráfico de Levey-Jennings e analisados de acordo com as regras de Westgard. No caso de alguma destas regras ser violada, é necessário perceber o que provocou o erro, corrigi-lo e repetir o controlo. Quando o controlo estiver conforme as regras de Westgard, é aceite e pode iniciar-se o processamento das amostras dos pacientes.

São utilizados vários materiais de controlo em simultâneo, com diferentes níveis do analito que se pretende quantificar, conforme indicado na Tabela XIII.

**Tabela XIII:** Número de níveis de materiais de controlo de qualidade interno utilizados nos diferentes parâmetros.

Setor	Parâmetro	Nº de níveis de controlo
Hematologia	Hemograma e Reticulócitos	3: nível normal, alto e baixo
	VS	3: nível normal, alto e baixo
	Provas de Coagulação	2: nível normal e baixo ou normal e alto
Bioquímica Clínica	Iões ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Ca}^{2+}$ )	3: nível normal, alto e muito alto
	Restantes parâmetros	2: nível normal e alto
Imunologia/Hormonologia	Todos os parâmetros	2: nível normal e alto

No setor da Microbiologia, o controlo de qualidade interno é feito de forma diferente. Periodicamente, é feito o controlo microbiológico dos meios de cultura, incubando uma placa a 37°C, durante 24 a 48h, sem inoculação. Avalia-se depois se há ou não crescimento de microrganismos. Também se faz o controlo microbiológico da solução salina utilizada para preparar as suspensões bacterianas e dos reagentes utilizados nas colorações e nas provas bioquímicas, inoculando uma placa de COS por inundação e incubando a 37°C, durante 24 a 48h.

Realiza-se ainda o controlo das cartas de identificação e TSA utilizadas no Vitek<sup>®</sup> 2, com periodicidade variável. Para isto, é preparada uma suspensão bacteriana de densidade adequada a partir de uma estirpe ATCC, e efetua-se a identificação e TSA dessa estirpe no Vitek<sup>®</sup> 2, de modo a verificar a boa qualidade das cartas utilizadas.

### **Controlo de qualidade externo**

O controlo de qualidade externo tem como objetivo avaliar a exatidão dos resultados laboratoriais obtidos. À exceção da Microbiologia, todos os setores do SPC o realizam mensalmente, para todos os parâmetros determinados automaticamente.

O SPC participa em dois programas de controlo de qualidade externa: RIQAS (Randox) e NEQAS (organização britânica). Mensalmente, a organização responsável pelo controlo de qualidade envia ao laboratório uma amostra cega. Isto significa que os analitos em avaliação existem na amostra em concentração desconhecida.

Após realização do controlo de qualidade interno e início do processamento das amostras de pacientes, a amostra de controlo de qualidade externo é introduzida no ciclo de trabalho do setor, como se se tratasse da amostra de um paciente. Os resultados obtidos são depois enviados à entidade responsável, que os analisa e envia um relatório de avaliação. Nesse relatório é possível avaliar a exatidão dos resultados obtidos, bem como fazer uma comparação entre os vários laboratórios participantes no programa. Essa comparação pode ser feita por método ou por analisador utilizado. Isto é, o setor da Bioquímica Clínica pode analisar o resultado que obteve para o Sódio em relação a todos os laboratórios que determinaram este parâmetro por potenciometria indireta, ou em relação a todos os laboratórios que fizeram a determinação no Cobas<sup>®</sup> 6000.

O setor da Microbiologia segue uma rotina diferente. Por ano, são realizados 4 ensaios de Bacteriologia, 4 de Parasitologia e 3 de Micologia.

As amostras para controlo de Bacteriologia e Micologia estão liofilizadas. Por cada ensaio de Bacteriologia são enviadas 4 amostras diferentes para análise, que podem conter um ou mais microrganismos. Por cada ensaio de Micologia são enviadas 3 amostras diferentes, cada uma com apenas um microrganismo. As amostras são acompanhadas de um pequeno relatório que simula a história clínica de um doente, de forma a orientar o laboratório no processamento das amostras. Após hidratação, são incubadas a 37°C, durante 30 minutos. Proceder-se então à sua sementeira, em meio de cultura adequado, e à sua incubação, de acordo com o microrganismo de que se suspeita. Os microrganismos existentes nas amostras enviadas são isolados e identificados, à semelhança do que acontece com as amostras de

doentes. Após a identificação e, quando indicado, realização do TSA, o relatório completo é enviado à entidade responsável pelo controlo de qualidade externo.

O controlo de qualidade externo de Parasitologia consiste também em 4 amostras diferentes. Estas amostras podem ser esfregaços de sangue periférico, já preparados, ou fezes formolizadas. No caso das fezes, deve preparar-se um exame a fresco entre lâmina e lamela. Em qualquer dos casos, as lâminas devem ser observadas para pesquisa de estruturas parasitárias. Após essa observação, identificam-se as estruturas e o microrganismo a que pertencem e o relatório completo é enviado à entidade responsável pelo controlo externo da qualidade.



Apesar de fisicamente individualizados, todos os setores do SPC trabalham paralelamente no sentido de fornecer ao clínico os resultados necessários ao diagnóstico ou seguimento dos pacientes. De todos os casos que tive a oportunidade de analisar durante o estágio, destaco os casos de Mieloma Múltiplo por demonstrarem a interligação entre as quatro valências do laboratório. Apresento, de seguida, um dos casos com que contactei durante o período de estágio.

## Caso Clínico – Mieloma Múltiplo

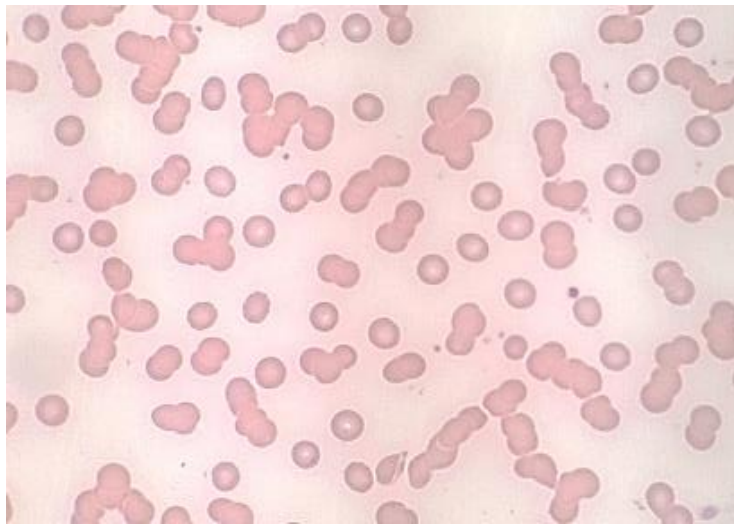
Uma paciente do sexo feminino, de 72 anos, recorre ao Serviço de Urgência com queixas de dor aguda na parte superior de um dos braços. A doente indica que a dor começou no autocarro, após um desequilíbrio e consequente embate contra um dos bancos. Quando questionada acerca de outras queixas, a doente refere fraqueza e dores constantes na região da coluna lombar. O exame físico revela palidez, mucosas descoradas e baixo peso.

Foram requisitados exames laboratoriais, cujos resultados estão apresentados nas Tabelas XIV a XVI e nas figuras 23 e 24.

Realizaram-se ainda exames imagiológicos: uma radiografia ao braço, que revelou uma fratura do úmero, e uma radiografia à coluna vertebral, que evidenciou perda de densidade óssea e lesões osteolíticas.

**Tabela XIV:** Parâmetros determinados no setor da Hematologia para a paciente em estudo, de interesse para o diagnóstico/monitorização de Mieloma Múltiplo. M: Masculino; F: Feminino.

Parâmetro	Resultado	Valores de referência
GB	$7.3 \times 10^9/l$	$4.0 - 11.0 \times 10^9/l$
Neutrófilos	71.8%	45 - 70%
Linfócitos	13.8%	20 - 40%
Monócitos	14.0%	3 - 10%
Eosinófilos	0.20%	1 - 5%
Basófilos	0.20%	0 - 2%
GV	$2.4 \times 10^{12}/l$	$4.0 - 5.5 \times 10^{12}/l$
Hemoglobina	7.4 g/dl	12 - 16 g/dl
Hematócrito	22.0%	35 - 47%
VCM	92.2 fl	85 - 95 fl
HCM	31.2 pg	27 - 32 pg
CHCM	33.9 g/dl	32 - 36 g/dl
RDW	16.0%	11.5 - 14.5%
Plaquetas	$201 \times 10^9/l$	$150 - 450 \times 10^9/l$
VS	74 mm/h	0 - 20 mm/h



**Figura 23:** Esfregaço de sangue periférico com “rouleaux”. Foto SPC-IPOC.

**Tabela XV:** Parâmetros determinados no setor da Bioquímica Clínica para a paciente em estudo, de interesse para o diagnóstico/monitorização de Mieloma Múltiplo.

Parâmetro	Resultado	Valores de referência
Ureia	41 mg/dl	10 – 50 mg/dl
Creatinina	0.8 mg/dl	0.5 – 1.2 mg/dl
Cálcio total	8.8 mg/dl	8.6 – 10.5 mg/dl
Fosfato	2.7 mg/dl	2.5 – 5.0 mg/dl
Fosfatase Alcalina	198 U/L	< 117 U/l
LDH	540 U/l	250 – 480 U/l
Proteínas totais no soro	12.0 g/dl	6.0 – 8.0 g/dl
Albumina	3.7 g/dl	3.5 – 5.0 g/dl

**Tabela XVI:** Parâmetros determinados no setor da Imunologia/Hormonologia para a paciente em estudo, de interesse para o diagnóstico/monitorização de Mieloma Múltiplo.

Parâmetro	Resultado	Valores de referência
IgG (soro)	8080.0 g/dl	700 – 1600 g/dl
IgA (soro)	23.4 g/dl	70 – 400 g/dl
IgM (soro)	12.0 g/dl	40 – 230 g/dl
Cadeias κ livres (soro)	257.0 g/dl	3.30 – 19.4 g/dl
Cadeias λ livres (soro)	2.66 g/dl	5.71 – 26.30 g/dl
κ / λ (soro)	96.62	0.26 – 1.65
Imunofixação (soro)	Presença de uma banda monoclonal IgG κ.	

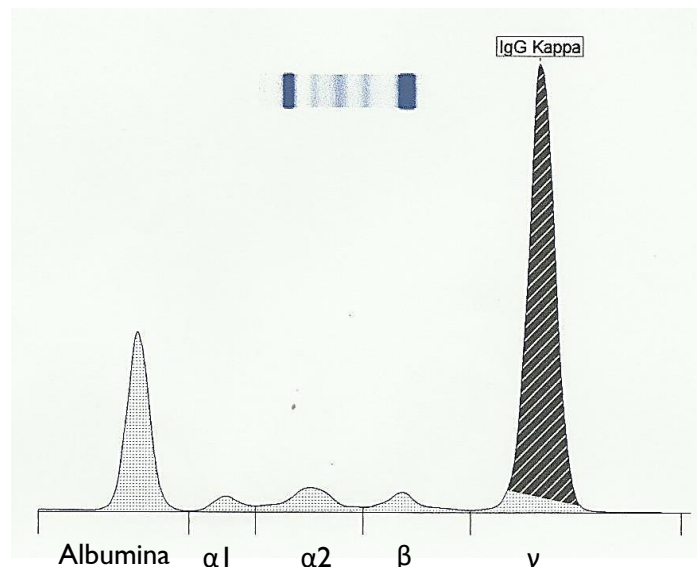


Figura 24: Resultado da eletroforese das proteínas do soro.

## Discussão do Caso Clínico

O diagnóstico proposto foi de Mieloma Múltiplo, de acordo com as queixas da doente, com os meios complementares de diagnóstico e com os critérios de diagnóstico estabelecidos para esta doença, apresentados na Tabela XVII.

Tabela XVII: Critérios de diagnóstico de Mieloma Múltiplo [39].

Devem verificar-se ambos os critérios
1. Plasmócitos constituem mais de 10% das células da medula óssea
2. Existência de um ou mais dos seguintes eventos característicos de Mieloma Múltiplo:
a. Lesão orgânica atribuída à proliferação de plasmócitos (hipercalcemia, lesão renal, anemia, lesão óssea);
b. Plasmócitos monoclonais constituem mais de 60% das células da medula óssea;
c. Relação entre cadeias leves: associada à doença/não associada > 100;
d. Lesões características da doença evidentes em exames imagiológicos.

Deve suspeitar-se desta patologia, e a sua existência deve ser averiguada, em indivíduos com idade superior a 40 anos e com sintomas sugestivos de hipercalcemia, insuficiência renal, anemia, dor óssea, infeções recorrentes ou VS aumentada. A incidência desta doença é ligeiramente superior em indivíduos do sexo masculino e a idade média de diagnóstico situa-se nos 69 anos [40].

A doença é marcada pela proliferação e acumulação de plasmócitos na medula óssea. A sua maturação é estimulada por fatores de crescimento que, paralelamente, elevam a atividade osteoclástica. Estes são dois critérios de diagnóstico de MM.



A destruição óssea provoca aumento das concentrações plasmáticas de cálcio, fosfato e da isoenzima óssea da fosfatase alcalina. As lesões osteolíticas evidenciadas em radiografias ou outros exames imagiológicos são características e constituem outro critério de diagnóstico.

A acumulação de plasmócitos traz outras consequências nefastas, como a falência da medula óssea, associada a anemia (normocítica normocrômica), neutropenia e trombocitopenia [40,41]. Por outro lado, a produção excessiva de Ig monoclonais leva ao aumento das proteínas plasmáticas, que provoca aumento da VS, GV em pilha de moedas (rouleaux) e lesão renal com eventual falência. Isto causa o aumento dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina e, a longo prazo, a perda de proteína na urina (proteinúria). Assim, podem ser detetadas na urina não só as Ig monoclonais como também a albumina. Esta, devido à pequena dimensão, é a primeira proteína plasmática a ser perdida [40,41].

Devido à neutropenia e à disfuncionalidade dos plasmócitos existentes, os doentes com MM estão também muito mais suscetíveis a infeções. O quadro sintomatológico característico da doença sumaria-se na Tabela XVIII.

**Tabela XVIII:** Quadro sintomatológico característico de MM [40,41].

<b>Exame recomendado</b>	<b>Alterações frequentes</b>
Hemograma	Anemia normocítica normocrômica
	Neutropenia
	Trombocitopenia
Velocidade de sedimentação	Aumentada
Esfregaço de sangue periférico	Presença de rouleaux
Medulograma	Infiltração por plasmócitos
Imunofenotipagem	População monoclonal suspeita de plasmócitos
Determinações no soro	Ureia aumentada
	Creatinina aumentada
	Proteínas totais aumentadas
	Albumina diminuída
	Cálcio aumentado
	Fosfato aumentado
	Fosfatase Alcalina aumentada
	LDH aumentada
	Aumento de uma das frações de Ig séricas
	Aumento de uma das cadeias leves ( $\kappa$ ou $\lambda$ )
Determinações na urina de 24h	Proteinúria
Eletroforese de proteínas	Soro: Aumento acentuado da fração das $\gamma$ -globulinas
	Urina de 24h: proteína de Bence-Jones
Imunofixação (soro e urina de 24h)	Banda intensa de uma das fracções de Ig e de uma das cadeias leves
Exame microbiológico	Maior incidência de infeções por microrganismos oportunistas

Os resultados obtidos para a paciente com suspeita MM coincidem com os sinais mais comuns nesta doença.

A análise da Tabela XIV permite perceber que a doente apresenta uma anemia normocítica normocrómica, já que a hemoglobina está abaixo dos valores de referência, tendo o VCM e o HCM valores normais. No entanto, não se verifica trombocitopenia nem neutropenia. A doente apresenta ainda uma VS aumentada, o que se deve ao aumento das proteínas plasmáticas, como explicado previamente neste relatório. O rouleaux também é visível no esfregaço de sangue periférico da paciente, apresentado na figura 23.

A informação da Tabela XV não é compatível com um quadro de insuficiência renal, tendo em conta a normalidade dos níveis séricos de ureia, creatinina e albumina. Os níveis de LDH e Fosfatase Alcalina apresentam-se ligeiramente aumentados, sugerindo a existência de destruição celular óssea, o que é corroborado pelas lesões osteolíticas detetadas nos exames imagiológicos. Inesperadamente, os níveis de cálcio e fosfato não se encontram alterados.

A elevada concentração de proteínas totais, apesar da concentração normal de albumina, é compatível com a produção excessiva de Ig monoclonais característica de MM, o que se confirma pelos dados da Tabela XVI. No caso particular desta paciente, existe uma banda monoclonal de IgG, associada a cadeias leves Kappa. Este facto também é evidenciado pela relação entre cadeias leves ( $\kappa/\lambda$ ) e pelo resultado da eletroforese das proteínas do soro, apresentado na figura 24.

Ao contrário do que seria expectável, não existe histórico de infeções para a doente em questão, o que pode ser explicado pela manutenção do nível de neutrófilos dentro de valores normais.



## Conclusão

A conclusão deste relatório simboliza o termo de uma etapa: aproxima-se o final do Mestrado em Análises Clínicas e, com ele, o início da procura de um lugar no mercado de trabalho.

Sem dúvida que o Mestrado me facultou muitos conhecimentos, imprescindíveis à realização do Estágio Curricular e, no futuro, à prática profissional competente. No que respeita ao Estágio Curricular, realizado no SPC-IPOC, trouxe-me grandes conhecimentos práticos e teóricos, que me ajudaram a colmatar algumas das lacunas que possuía e a compreender melhor alguns aspetos que pudessem estar menos claros. Trouxe-me também a possibilidade de conhecer a realidade diária da doença oncológica, através do contacto com os doentes, da interpretação dos resultados laboratoriais e do convívio com os profissionais de saúde do laboratório, bastante familiarizados com a problemática da doença oncológica.

Este Estágio permitiu-me ainda uma grande evolução a nível pessoal, pela proximidade aos doentes e aos profissionais de saúde, que diariamente partilharam comigo o seu conhecimento, a sua experiência de vida e a sua forma de encarar e reagir às vicissitudes da vida. Tive ainda a possibilidade de participar na manutenção dos equipamentos do laboratório e na execução e interpretação do controlo de qualidade, de perceber quais as atitudes a tomar quando algo inesperado ocorre e de me familiarizar com a gestão de materiais e reagentes.

Apesar do elevado fluxo de trabalho e do cansaço que se foi acumulando ao longo do tempo, o Estágio Curricular e o Mestrado em Análises Clínicas foram experiências muito enriquecedoras a vários níveis, e proporcionaram-me uma das coisas que mais me agrada: conhecimento.



## Bibliografia

- [1] <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/sintomas-de-cancro> [Acedido a 22 de fevereiro de 2016]
- [2] <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/tratamentos-do-cancro> [Acedido a 22 de fevereiro de 2016]
- [3] <http://observador.pt/2016/02/04/infografia-cancro-portugal-no-mundo-8-graficos> [Acedido a 22 de fevereiro de 2016]
- [4] <https://ipocoimbratete.wordpress.com/historia/> [Acedido a 22 de fevereiro de 2016]
- [5] FOX, S.I. – **Blood, Heart, and Circulation**. In: FOX, S.I. – Human Physiology. 12ª Ed. New York: McGraw Hill, 2011, ISBN 978-0-07-337811-4. p. 400-414.
- [6] BRIGGS, C.; BAIN, B.J. – **Basic haematological techniques**. In: BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, ISBN 9780702034084. p. 23-56
- [7] **COULTER LH 750 System Reference**. Beckman Coulter Inc., 2013. [Acedido a 20 de abril de 2016]. Disponível na internet:  
[https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/ajax/downloadDocument/4277248DD.pdf?autonomyId=TP\\_DOC\\_32948&documentName=4277248DD.pdf](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/ajax/downloadDocument/4277248DD.pdf?autonomyId=TP_DOC_32948&documentName=4277248DD.pdf)
- [8] LAMCHIAGDHASE, P.; KUROSAKI, J.; IEMTIM, A. – **Evaluation of Nucleated Red Blood Cells in Thalassemia by the Coulter LH 750 Hematology Analyzer**. J Hematol Transf Med. Vol. 19, nº 1 (2008) p. 27-34.
- [9] HOROBIN, R.W.; WALTER, K.J. – **Understanding Romanowski Staining**. Histochemistry. Vol. 86 (1987) p. 331-336. DOI: 10.1007/BF00490267
- [10] **Essential Information for the Aerospray Hematology® Slide Stainer/Cytocentrifuge (Model 7150) its Accessories and Supplies**. Wescor Inc., 2009, p. 11-13. [Acedido a 23 de abril de 2016]. Disponível na internet:  
[http://www.wescor.com/translations/Aerospray\\_7150/EN/DOC-00324-ENA.pdf](http://www.wescor.com/translations/Aerospray_7150/EN/DOC-00324-ENA.pdf)
- [11] TURGEON, M.L. – **Manual Procedures in Hematology**. In: TURGEON, M.L. – Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5ª Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012, ISBN 978-1-60831-076-0. p. 498-525.
- [12] OSEI-BIMPONG, A.; BURTHEM, J. – **Supplementary techniques including blood parasite diagnosis**. In: BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, ISBN 9780702034084. p. 101-105.
- [13] CHA, C. et al. – **Erythrocyte Sedimentation Rate Measurements by TEST 1 Better Reflect Inflammation Than Do Those by the Westergren Method in Patients With Malignancy, Autoimmune Disease, or Infection**. Am J Clin Pathol. Vol 31, nº 2 (2009) p. 189-194.

- [14] GALE, A.J. – **Current Understanding of Hemostasis**. Toxicol Pathol. Vol. 39, nº 1 (2011) p. 273-280. DOI: 10.1177/0192623310389474
- [15] **The ACL TOP® Hemostasis Testing System: Features and Technical Description**. Instrumental Laboratory. [Acedido a 23 de abril de 2016]. Disponível na internet: [http://de.werfen.com/~media/IL\\_Shared/Docs/Hemostasis/Literature/130\\_The\\_ACL\\_TOP\\_Hemostasis\\_Testing\\_System\\_Feature\\_and\\_Technical\\_Description.pdf](http://de.werfen.com/~media/IL_Shared/Docs/Hemostasis/Literature/130_The_ACL_TOP_Hemostasis_Testing_System_Feature_and_Technical_Description.pdf)
- [16] LAFFAN, M.; MANNING, R. – **Laboratory control of anticoagulant, thrombotic and antiplatelet therapy**. In: BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, ISBN 9780702034084. p. 467-481.
- [17] HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. – **Platelets, blood coagulation and haemostasis**. In: HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. – Essential Haematology. 6ª Ed. Wiley-Blackwell, 2011, ISBN 978-1-4051-9890-5. p. 314-329.
- [18] MACKIE, I.J. et al. – **Guidelines on fibrinogen assays**. Br J Haematol. Vol. 121 (2003) p. 396-404. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04256.x
- [19] <http://emedicine.medscape.com/article/2085111-overview#a4> [Acedido a 24 de fevereiro de 2016].
- [20] ADCOCK, D.M.; FAVALORO, E.J. – **Pearls and pitfalls in factor inhibitor assays**. Int J Lab Hematol. Vol. 37 (2015) p. 52-60. DOI: 10.1111/ijlh.12352
- [21] DREWS, R.E. – **Critical issues in hematology: anemia, thrombocytopenia, coagulopathy, and blood product transfusions in critically ill patients**. Clin Chest Med. Vol. 24 (2003) p. 607 – 622. DOI: 10.1016/S0272-5231(03)00100-X
- [22] PENGU, V. et al. – **Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection**. J Thromb Haemost. Vol. 7 (2009) p. 1737-1740. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x
- [23] BATES, I.; BURTHEM, J. – **Bone marrow biopsy**. In: BAIN, B.J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Elsevier, 2011, ISBN 9780702034084. p. 123-137.
- [24] MANDAL, A. – **Flow Cytometry Principles**. 2014. [Acedido a 23 de abril de 2016]. Disponível na internet: <http://www.news-medical.net/life-sciences/Flow-Cytometry-Principles.aspx>
- [25] ALI, M.A.M. – **Chronic Myeloid Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors: Na Evolving Paradigm of Molecularly Targeted Therapy**. Mol Diagn Ther (2016) p. 1-19. DOI: 10.1007/s40291-016-0208-1
- [26] <http://www.radiometer.pt/pt-pt/products/blood-gas/abl800-flex-analyzer> [Acedido a 7 de março de 2016].

- [27] TILLE, P.M. – **Diagnostic by Organ System. Bloodstream infections.** In: TILLE, P.M. – Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13<sup>a</sup> Ed. Elsevier, 2014, ISBN 978-0-323-08330-0. p. 860-877.
- [28] FONSECA, A.B. et al. – **Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia.** Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004.
- [29] [www.bd.com/ds/productCenter/BC-Bactec.asp](http://www.bd.com/ds/productCenter/BC-Bactec.asp) [Acedido a 4 de maio de 2016].
- [30] MADIGAN, M.T. et al. – **A Brief Journey to the Microbial World.** In: MADIGAN, M.T. et al. – Brock Biology of Microorganisms. 13<sup>a</sup> Ed. Benjamin Cummings, 2012, ISBN 10: 0-321-64963-X. p. 24-46.
- [31] [http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?doc=PTG\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_217](http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_217) [Acedido a 30 de abril de 2016].
- [32] MADIGAN, M.T. et al. – **Other *Bacteria*.** In: MADIGAN, M.T. et al. – Brock Biology of Microorganisms. 13<sup>a</sup> Ed. Benjamin Cummings, 2012, ISBN 10: 0-321-64963-X. p. 517-555.
- [33] BROOKS, G.F. et al. – **Mycobacteria.** In: BROOKS, G.F. et al. – Jawetz, Melnick, & Alderberg's Medical Microbiology. 26<sup>a</sup> Ed. McGraw-Hill, 2013, ISBN: 978-0-07-181578-9. p. 313-326
- [34] TILLE, P.M. – **Infections of the Urinary Tract.** In: TILLE, P.M. – Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13<sup>a</sup> Ed. Elsevier, 2014, ISBN 978-0-323-08330-0. p. 919-930.
- [35] MONEY, D. - **The laboratory diagnosis of bacterial vaginosis.** Can J Infect Dis Med Microbiol. Vol. 16, n<sup>o</sup> 2 (2005) p. 77-79.
- [36] [http://www.who.int/ihr/lyon/surveillance/methods/ihr\\_II/rapiddiagnostictests\\_en.ppt](http://www.who.int/ihr/lyon/surveillance/methods/ihr_II/rapiddiagnostictests_en.ppt) [Acedido a 27 de maio de 2016].
- [37] GAILLOT, O. et al - **Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Hektoen Enteric Agar for Isolation of Salmonellae from Stool Samples.** J Clin Microbiol. Vol. 37, n<sup>o</sup> 3 (1999) p. 762-765.
- [38] TILLE, P.M. – **Principles of Identification. Overview of Identification Methods and Strategies.** In: TILLE, P.M. – Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13<sup>a</sup> Ed. Elsevier, 2014, ISBN 978-0-323-08330-0. p. 193-231.
- [39] RAJKUMAR, S.V. – **Myeloma today: Disease definitions and treatment advances.** Am J Hematol. Vol 91, n<sup>o</sup> 1 (2016) p. 90-100. DOI: 10.1002/ajh.24236
- [40] SINGER, C.R.J. – **Multiple Myeloma and Related Conditions.** In: PROVAN, D. – ABC of Clinical Haematology. 3<sup>a</sup> Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, ISBN 978-1-4051-5353-9. p.45-51.



[41] KYLE, R.A; RAJKUMAR, S.V. – **Criteria for Diagnosis and Response**. In: GERTZ, M.A.; RAJKUMAR, S.V. – **Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment**. New York: Springer, 2014, ISBN 978-1-4614-8520-9. p.1-16.