



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Andreia Maria Rocha Correia

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pelo Dr. Luís do Espírito Santo Nina e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021





FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

**Andreia Maria Rocha Correia**

## **Relatório de Estágio**

**Mestrado em Análises Clínicas**

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pelo Dr. Luís do Espírito Santo Nina e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágios realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, no período entre 11 de janeiro e 11 de março de 2021 e no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. no período entre 15 de março a 16 de julho de 2021.

Abordagem de todas as valências, com detalhe na Microbiologia e Hematologia e das atividades e metodologias relacionadas especificamente com o diagnóstico da COVID-19.

Outubro de 2021



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Ana Miguel, pela oportunidade de realizar parte do meu estágio no LACUC, pelos conselhos que deu, pela paciência, simpatia e calma que transmitiu, pelo esclarecimento de dúvidas e pela ajuda na correção de parte do meu relatório.

À Equipa B do LACUC, a melhor equipa que podia ter tido, o meu muito obrigada pela ajuda, companheirismo, espírito de equipa, apoio, ensinamentos e gargalhadas. Agradeço em especial à Daniela Veiga pela amizade e ombro amigo nos momentos difíceis, por me ouvir e ter estado lá quando precisei.

Ao Dr. Luís Nina pela oportunidade de realizar o estágio no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG. Ao Jorge Reis da Hematologia por ser o mais porreiro lá do sítio, muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos, pela ajuda, tanto no estágio como na correção do relatório e pelo à vontade que deu. Obrigada também à Dra. Maria Alexandre e à Dra. Ana Paiva pelos interessantes e inúmeros ensinamentos transmitidos, pela simpatia e compreensão.

À Professora Doutora Maria do Céu, pela disponibilidade, atenção e pelo tempo despendido na correção/revisão do meu relatório, pelas correções e sugestões de melhoria.

Às amigas que ganhei neste curso e que espero manter na minha vida, Patrícia, Catarina e Inês, foram a melhor parte deste percurso, obrigada por tudo. Especial obrigada à Catarina, também minha companheira de estágio, por me ajudares, por me equilibrares, por me acompanhares nas brincadeiras, a minha parceira no crime, sem ti o estágio não teria sido o mesmo.

Ao Ismael, pelo amor, carinho, motivação e pelas palavras de apoio nesta última etapa.

Aos meus amigos de sempre, Sara, Mara e Gonçalo, que levo comigo para a vida, obrigada por me acompanharem neste percurso, pela ajuda, amizade e motivação e por estarem sempre lá para mim, mesmo que longe.

À minha família. À minha avó Noémi, pelo amor, pela preocupação, pela cumplicidade e pela alegria que me dá. Ao meu avô, que olha por mim.

À minha mãe Cláudia, o meu grande pilar, pelo apoio e amor incondicional, pelo incentivo, motivação e preocupação, por ser a voz da razão e por estar sempre lá. Eu não seria nada sem ti.



# Índice

Índice de Figuras .....	VII
Índice de Tabelas .....	VIII
Abreviaturas e Siglas .....	IX
Resumo .....	XI
Abstract .....	XI
Introdução .....	I
Capítulo I – Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra.....	3
1. Caracterização do Laboratório .....	5
2. Diagnóstico laboratorial da infeção por SARS-CoV-2.....	5
2.1. Fase Pré-Analítica .....	6
2.2. Procedimento Analítico .....	7
2.2.1. Inativação e Extração do RNA viral .....	7
2.2.2. Amplificação e deteção do SARS-CoV-2 por RT-PCR .....	9
2.3. Interpretação e validação dos resultados .....	10
3. Controlo de qualidade .....	11
3.1. Controlo de Qualidade Interno .....	12
3.2. Avaliação Externa da Qualidade.....	12
Capítulo II – Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG.....	15
1. Caracterização do Laboratório .....	17
2. Fase Pré-Analítica .....	17
3. Setor de Química Clínica .....	18
4. Setor de Imunologia/Hormonologia .....	19
5. Setor de Hematologia .....	20
5.1. Hemograma .....	22
5.1.1. Alterações mais comuns no hemograma.....	25
5.2. Velocidade de Sedimentação (VS) .....	28
5.3. Esfregaço de sangue periférico e alterações morfológicas.....	29
5.4. Avaliação Laboratorial da Função Hemostática.....	32
5.4.1. Parâmetros de rotina .....	32
5.5. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	35
6. Setor de Microbiologia .....	36
6.1. Exame Direto .....	37
6.1.1. Colorações .....	38
6.2. Exame cultural e meios de cultura .....	39
6.3. Processamento laboratorial das amostras biológicas.....	41
6.3.1. Urinas .....	42
6.3.2. Sangue .....	44
6.3.3. Amostras do trato respiratório inferior.....	46
6.3.4. Exsudatos purulentos.....	50

6.4. Identificação microbiana (ID) e Testes de suscetibilidade a antibióticos (TSA) .....	51
6.4.1. Identificação presuntiva por provas bioquímicas – Teste da oxidase .....	52
6.4.2. Biologia molecular .....	52
6.4.3. <i>Vitek 2 Compact 15</i> : Identificação definitiva e TSA .....	53
6.4.4. TSA manuais: Método de Kirby-Bauer e E-test.....	54
6.4.5. Pesquisa de mecanismos de resistência.....	56
7. Controlo de Qualidade .....	58
Conclusão .....	59
Bibliografia .....	61
Anexo .....	73

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática do novo Coronavírus. _____	6
<b>Figura 2</b> - Kit de colheita usado no LACUC para o diagnóstico do SARS-CoV-2. _____	7
<b>Figura 3</b> - Alguns parâmetros de um gráfico de PCR. _____	10
<b>Figura 4</b> - Exemplos de gráficos obtidos no RT-PCR de amostras analisadas no LACUC. _____	11
<b>Figura 5</b> - Alguns tipos de células sanguíneas. _____	23
<b>Figura 6</b> - Representação gráfica dos histogramas obtidos pelo auto-analisador DxH900. _____	24
<b>Figura 7</b> - Possíveis causas de anemia baseadas na contagem de reticulócitos e no Volume Corpuscular Médio (VCM). _____	26
<b>Figura 8</b> - Exemplos de causas de trombocitopenia, divididas conforme o mecanismo subjacente. _____	28
<b>Figura 9</b> - Representação gráfica da técnica de preparação manual de um esfregaço sanguíneo. _____	30
<b>Figura 10</b> - Representação da cascata da coagulação " <i>in vitro</i> " com as diferentes vias e respetivos testes de avaliação. _____	33
<b>Figura 11</b> - Foto de núcleos celulares após a técnica de FISH. _____	35
<b>Figura 12</b> - Foto de bactérias coradas pela coloração de Gram. _____	38
<b>Figura 13</b> - Representação esquemática do esgotamento quantitativo usado nas uroculturas. _____	42
<b>Figura 14</b> - Imagens de uroculturas positivas em meio CLED, após repicagem. _____	43
<b>Figura 15</b> - Representação esquemática do esgotamento do produto á superfície (4 planos). _____	45
<b>Figura 16</b> - Colónias de <i>Haemophilus</i> spp. em meio PVX. _____	48
<b>Figura 17</b> - Observação microscópica de <i>Aspergillus</i> spp. numa amostra respiratória (40x). _____	48
<b>Figura 18</b> - Colónias características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio Lowenstein-Jensen. _____	50
<b>Figura 19</b> - Colónias de <i>Staphylococcus aureus</i> em meios COS, com beta-hemólise. _____	51
<b>Figura 20</b> - Método Kirby-Bauer e leitura de resultados. _____	56
<b>Figura 21</b> - Tira de E-test em meio MHE. _____	56
<b>Figura 22</b> - Pesquisa de ESBL e carbapenemases pelo método de Kirby-Bauer em meio MHE. _____	57

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b> - Equipamentos e respetivos métodos de análise, funções e parâmetros analisados do setor de Química Clínica do SPC-IPOCFG.....	19
<b>Tabela II</b> - Equipamentos e respetivas funções do setor de Hematologia do SPC-IPOCFG. .....	21
<b>Tabela III</b> - Amostras mais frequentes e respetivas análises do setor de Hematologia do SPC-IPOCFG. ....	22
<b>Tabela IV</b> - Exemplos de causas de neutropenia.....	27
<b>Tabela V</b> - Exemplos de algumas alterações morfológicas das células sanguíneas, descrição e imagens. ....	31
<b>Tabela VI</b> - Equipamentos e respetivas funções do setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG. .....	37
<b>Tabela VII</b> - Alguns dos meios de cultura utilizados para o exame cultural no setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.....	40
<b>Tabela VIII</b> - Critérios de Murray & Washington, usados para avaliar a qualidade de uma expectoração.....	47
<b>Tabela IX</b> - Interpretação de esfregaços para pesquisa de BAAR pela coloração de Kinyoun.....	49
<b>Tabela X</b> - Tipos de cartas de identificação utilizadas pelo sistema Vitek 2 Compact 15 e respetivos microrganismos que identificam, bem como as densidades necessárias para a suspensão. ....	53
<b>Tabela XI</b> - Cartas de TSA disponíveis no Setor de Microbiologia e respetivos microrganismos a que se destinam.....	54
<b>Tabela XII</b> - Equipamentos e respetivos métodos de análises e parâmetros avaliados no Setor de Imunologia do SPC-IPOCFG.....	73

## Abreviaturas e Siglas

**aPTT** - Tempo de Tromboplastina Parcial ativado

**BAAR** - Bacilo ácido-álcool resistente

**BHI** - Caldo Coração-Cérebro (do inglês “*Brain-Heart Infusion*”)

**CHUC** - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

**CI** - Controlo Interno

**CLED** - Meio Cistina – lactose deficiente em eletrólitos

**CMI** - Concentração Mínima Inibitória

**CNA** - Meio gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro, colistina e ácido nalidíxico

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**COS** - Meio gelose Columbia suplementada com 5% de sangue de carneiro

**COVID-19** - *Coronavirus Disease 2019*

**CQE** - Controlo de Qualidade Externo

**CQI** - Controlo de Qualidade Interno

**Ct** - do inglês “*Cycle-Threshold*”

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**dNTPs** - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetraacético (do inglês “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”)

**ESBL** -  $\beta$ -lactamases de espetro alargado (do inglês “*Extendend-Spectrum Beta-Lactamases*”)

**EUCAST** - Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (do inglês “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*”)

**FISH** - Hibridização *in situ* fluorescente (do inglês “*Fluorescence in situ hybridization*”)

**HCM** - Hemoglobina corpuscular média

**ID** - Testes de identificação

**IPOCFG** - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

**ITU** - Infecções do trato urinário

**KCS** - Caldo Schaedler com vitamina K<sub>3</sub>

**LACUC** - Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra

**LJ** - Meio Löwenstein-Jensen

**MGIT** - Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias

**MHE** - meio Mueller-Hinton

**MHF** - meio Mueller-Hinton *Fastidious*

**PBP** - proteína de ligação à penicilina (do inglês “*Penicilin-binding protein*”)

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)

**PLT** - Plaquetas

**PVX** - Meio gelose de chocolate PolyViteX

**RBC** - Eritrócitos (do inglês “*Red Blood Cells*”)

**RDW** - Amplitude de distribuição eritrocitária (do inglês “*Red Cell Distribution Width*”)

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa

**SARS-CoV-2** - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

**SPC** - Serviço de Patologia Clínica

**TP** - Tempo de Protrombina

**TSA** - Testes de suscetibilidade a antimicrobianos

**TSDT** - Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica

**TT** - Tempo de Trombina

**UFC** - Unidades formadoras de colónias

**VCM** - Volume corpuscular médio

**VCS** - Volume, Condutividade, dispersão da luz (do inglês “*Volume, Conductivity, Light-scatter*”)

**VS** - Velocidade de sedimentação

**WBC** - Leucócitos (do inglês “*White Blood Cells*”)



## Resumo

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular no âmbito do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu em dois laboratórios diferentes, iniciando-se no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) entre janeiro e março de 2021, tendo terminado no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) no período decorrido entre março e julho de 2021.

Primeiramente serão descritas as metodologias e os procedimentos relacionados exclusivamente com o diagnóstico da COVID-19, realizados no LACUC. De seguida serão abordadas as áreas de Microbiologia e Hematologia. Este ênfase deve-se ao facto de serem as duas valências escolhidas para abordar detalhadamente, tanto a nível teórico como prático.

Será também apresentado uma breve caracterização de ambos os laboratórios, das fases analíticas e do controlo de qualidade.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas; Microbiologia; Hematologia; COVID-19; LACUC; IPO.

## Abstract

This report aims to describe the activities developed during the curricular internship under the Master's degree in Clinical Analyses of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The internship took place in two different laboratories, starting at the Laboratory of Clinical Analyses of the University of Coimbra, between January and March 2021, and lastly at the Portuguese Institute of Oncology of Coimbra Francisco Gentil in the period between March and July 2021.

First, the methodologies and procedures related exclusively to the diagnosis of COVID-19, performed at LACUC, will be described. The areas of Microbiology and Hematology will then be addressed. This emphasis is due to the fact that they are the two valences chosen to address in detail, both at a theoretical and practical level.

A brief characterization of both laboratories, analytical phases and quality control will also be presented.

**Keywords:** Clinical Analyses; Microbiology; Hematology; COVID-19; LACUC; IPO.



## Introdução

Em 2020 a nossa realidade mudou ao sermos assolados por uma pandemia sem precedentes, obrigando a novas mudanças e adaptações.

A doença COVID-19, causada pelo novo coronavírus, veio de certo modo dar ainda mais ênfase ao papel dos profissionais de saúde que se encontram todos os dias na linha da frente a dar o seu melhor e veio também lembrar a importância dos laboratórios de análises clínicas e nos que aí trabalham. Estes são indispensáveis para testar e realizar o diagnóstico, não só da COVID-19, mas de muitas outras patologias como por exemplo o cancro, cujas análises laboratoriais são dos meios complementares mais importantes para o diagnóstico e monitorização da doença/terapêutica, demonstrando assim o papel fundamental dos laboratórios de análises clínicas na prestação de cuidados de saúde e também para a saúde pública.

Em tempos de pandemia, a sobrecarga dos hospitais, dos laboratórios e dos recursos humanos neles existentes, levou a que esta nova doença fosse quase a (única) prioridade, quando os esforços tinham de ir no sentido de manter um equilíbrio nos cuidados de saúde, pois ficaram diagnósticos, tratamentos e cirurgias por fazer e há morte para além da COVID-19.

O presente estágio curricular, foi realizado durante um período de cerca de 6 meses, compreendidos entre janeiro e julho de 2021, com o objetivo de consolidar e adquirir novos conhecimentos em contexto real de trabalho. O estágio foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra e no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG), permitindo contactar com diferentes áreas das análises clínicas.

O relatório está então dividido em dois capítulos, sendo que o primeiro se foca exclusivamente nos procedimentos e métodos para o diagnóstico da COVID-19, bem como uma descrição geral do laboratório e do controlo de qualidade. No segundo capítulo, o foco vai para as valências da Hematologia e da Microbiologia, com uma descrição geral do laboratório, das áreas de Química Clínica e Imunologia/Hormonologia e do controlo de qualidade.



# **Capítulo I**

**Laboratório de Análises Clínicas**

**da Universidade de Coimbra**



## **I. Caracterização do Laboratório**

O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) encontra-se aberto ao público desde outubro de 1983, prestando serviços de análises clínicas não só à comunidade académica da Universidade de Coimbra, como também à população em geral, devido aos protocolos que mantém com diversos serviços de saúde, incluindo o Sistema Nacional de Saúde (SNS).

Com o início da pandemia em 2020, o laboratório modificou-se para responder às novas necessidades, tendo-se dedicado exclusivamente ao rastreio e diagnóstico de COVID-19 (“*Corona Virus Disease 2019*”). Desde abril de 2020 que o laboratório está localizado no piso 3 da Faculdade de Medicina (Pólo I da Universidade de Coimbra) onde também se localiza o posto de colheitas (piso 2).

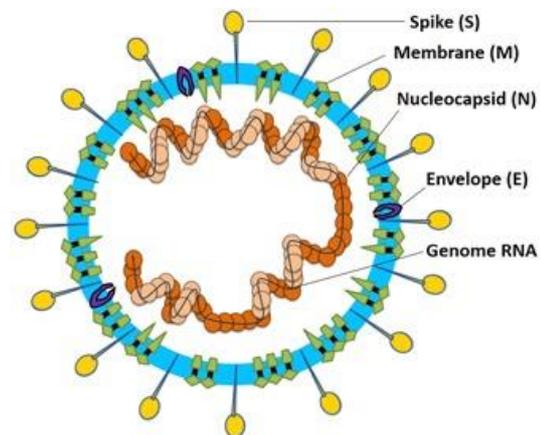
O laboratório conta com a Direção Técnica da Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e da Doutora Patrícia Madaleno, responsáveis pela validação biopatológica dos resultados e pela chefia das equipas que trabalham no LACUC. Ao nível da prática laboratorial as equipas são altamente multidisciplinares, enquanto que a vertente burocrática, gestão de materiais e atendimento ao cliente são asseguradas por assistentes administrativos. As colheitas de amostras são realizadas por técnicos/as de Análises Clínicas, farmacêuticos/as ou enfermeiros/as.

O LACUC possuía capacidade para realizar 400 a 500 testes por dia, sendo que esta foi aumentada em fevereiro de 2021 com a aquisição de um novo equipamento. Atualmente, o LACUC capacidade para processar 800 a 1200 amostras diariamente. Todos os equipamentos do laboratório são automatizados, de forma a garantir a fidedignidade e a rapidez dos resultados e também a diminuir possíveis erros de manuseamento.

## **2. Diagnóstico laboratorial da infeção por SARS-CoV-2**

O novo coronavírus, pertencente à família *Coronaviridae*, é responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) 2, tomou o mundo de assalto em 2020. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o primeiro caso humano da doença apareceu na cidade de Wuhan na China a dezembro de 2019. Três meses depois, em março, o SARS-CoV-2 foi declarado como pandemia devido aos níveis alarmantes de propagação.

O SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2) é um vírus envelopado, de genoma RNA cadeia simples, polaridade positiva (Boopathi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020), que codifica quatro proteínas estruturais (Magalhães, 2020), as proteínas da espícula, da membrana, do envelope e do nucleocapsídeo, representadas na Figura 1. A espícula apresenta um duplo papel ao mediar a ligação do vírus ao recetor da célula alvo e a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira (Belouzard *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2020), com consequente libertação do nucleocapsídeo para o citoplasma da célula. A tradução do genoma viral permite a formação de mais proteínas estruturais que depois irão ser reunidas e “montadas” para formar os novos virões, que abandonam a célula hospedeira por exocitose, prontos para infetarem outras células.



**Figura 1** - Representação esquemática do novo Coronavírus. O SARS-CoV-2 é um vírus RNA de cadeia simples e é constituído pelas proteínas de superfície (S), da membrana (M), do envelope (E) e do nucleocapsídeo (N), todas estruturais.

Fonte: Li *et al.*, 2020.

## 2.1. Fase Pré-Analítica

O LACUC recebe amostras de diferentes locais da zona centro de Portugal com os quais estabeleceu protocolos. Destes são exemplo o Instituto Português de Oncologia (IPO) de Coimbra, o Instituto de Medicina Legal ou com a Associação Regional de Saúde (ARS) Centro (Drive-ins, lares de idosos, centros de saúde, associações etc.). Em junho e julho de 2020, o laboratório estabeleceu também protocolos com os governos das regiões autónomas da Madeira dos Açores, de modo a que os passageiros que se deslocam para as regiões possam realizar o teste à COVID-19 com antecedência, mediante agendamento prévio. Mais recentemente, qualquer pessoa que tenha uma requisição médica do Sistema Nacional de Saúde ou particulares (mediante pagamento), pode realizar o teste no LACUC. O laboratório realiza testes moleculares por RT-PCR em tempo real (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa), testes rápidos (pesquisa de antigénio do SARS-CoV-2) e testes serológicos (deteção de anticorpos IgM e IgG contra o SARS-CoV-2). Destes, apenas o primeiro teste será abordado por ser o mais comum e o que mais observei e efetuei durante o estágio.

No piso 2 do antigo edifício faculdade de medicina do Pólo I está localizada a sala de colheitas do laboratório. As colheitas para o diagnóstico do SARS-CoV-2 são realizadas (maioritariamente) através da colheita de exsudato da nasofaringe com uma zaragatoa

(Magalhães, 2020), que é depois colocada num tubo contendo isotiocianato de guadinina em tampão Tris (Figura 2).

Após a colheita, cada tubo (contentor primário) é identificado com uma etiqueta, colocado num pequeno saco de transporte (contentor secundário) e por fim num pote (contentor terciário), segundo a orientação n.º 015/2020 de 23 de março de 2020 da Direção Geral de Saúde. Quando o contentor terciário estiver



**Figura 2** - Kit de colheita usado no LACUC para o diagnóstico do SARS-CoV-2.  
Fonte: LACUC.

cheio, segue para o piso superior para processamento, tanto para os testes rápidos, como para o RT-PCR. Em relação aos testes serológicos, é necessária uma colheita de sangue por punção venosa para um tubo sem anticoagulante que é posteriormente centrifugado, obtendo-se o soro para análise.

Tive também oportunidade de realizar a receção de amostras vindas de outros postos de colheitas, em que estas se fazem acompanhar por listas de requisição que contêm os dados dos utentes. De seguida, as amostras são registadas na base de dados do laboratório (recorrendo ao programa *Apollo*), onde é gerada uma etiqueta e é atribuído um código a cada utente.

## 2.2. Procedimento Analítico

A técnica padrão usada para a deteção do SARS-CoV-2 é o RT-PCR em tempo real, que tem como alvo diferentes regiões de genes específicos do vírus (OMS, 2020; Conceição *et al.*, 2020; Vieira, Emery e Andriolo, 2020). Para este teste é usado um controlo positivo, um controlo negativo e um controlo interno (CI).

O LACUC tem o sistema *Abbott m2000 RealTime System* e o *Abbott Alinity m* (da *Abbott Molecular*) para efetuar, de forma automatizada, a extração e purificação do RNA viral a partir de amostras previamente inativadas, a preparação da placa de PCR (apenas no caso do *Abbott m2000*) e por último, a amplificação dos genes específicos por RT-PCR.

### 2.2.1. Inativação e Extração do RNA viral

A inativação é um passo importante para garantir a segurança dos operadores no manuseamento das amostras nas fases seguintes, na qual tive oportunidade de participar várias vezes. É realizado numa câmara de fluxo laminar que se encontra numa sala com pressão

negativa. Para tal, os colaboradores (sempre em pares) têm de usar equipamento de proteção individual para garantir a proteção e segurança de cada um.

No processo de inativação viral utiliza-se uma solução de lise, que contém isotiocianato de guadinina e detergente. O agente caotrópico isotiocianato de guadinina é eficaz em desnaturar/inativar ribonucleases que possam estar na amostra e que iriam degradar o RNA (McGookin, 1984; Boom *et al.*, 1990; Bockel *et al.*, 2020). O detergente é eficaz contra vírus envelopados (o caso do SARS-CoV-2) visto que destabiliza a membrana lipídica do envelope, impedindo que o vírus se ligue e infete as células-alvo (OMS, 2004).

Posteriormente, as amostras são transportadas para fora da sala de inativação através duma *pass box*, desinfetadas e colocadas nos extratores, juntamente com os controlos. A extração do RNA viral realiza-se no *Abbott m2000sp* ou no *Alinity m*, conforme o nº de amostras e/ou a urgência destas.

O controlo negativo e um tubo com água (que são processados como amostras normais) servem como controlo de contaminação, permitindo assegurar que não houve contaminações durante a preparação das amostras nem durante o processamento automático desta. O controlo positivo contém genes do SARS-CoV-2, permitindo ao operador certificar-se que estes estão de facto a ser amplificados e detetados. Aquando da preparação das racks, um segundo colaborador prepara os reagentes necessários à extração. Os reagentes são constituídos por uma solução de lise, 2 soluções de lavagem, um tampão de eluição (água isenta de ribonucleases) e micropartículas (esferas magnéticas) em suspensão. O CI é adicionado à solução de lise, de forma a que, no decorrer do processamento automático, este seja adicionado a todos os tubos da corrida, com o objetivo de avaliar se o processo de extração, bem como o RT-PCR foi bem-sucedido para cada amostra.

De acordo com Slater (1984), “a extração bem-sucedida de RNA depende da quantidade de ácidos nucleicos puros que se consegue recuperar sob a forma não degradada”. A separação por magnetismo é uma tecnologia emergente, que permite separar partículas pequenas em suspensões biológicas complexas com recurso a esferas magnéticas (Berensmeier, 2006). Neste caso, o objetivo é extrair e concentrar o RNA viral, removendo potenciais inibidores da reação de PCR e outros componentes celulares e virais que estejam presentes na amostra. Isto é conseguido através da ligação seletiva das micropartículas ao RNA viral e consequente retenção para o fundo do tubo de extração através de um íman que o extrator possui. Usando as soluções de lavagem, o sobrenadante (componentes que não se ligaram às micropartículas) é removido e o RNA é eluído/separado das micropartículas usando o tampão de eluição, concluindo a extração. Este passo é importante, pois de acordo com Spanova *et al.* (2004) cit. por Berensmeier (2006), as micropartículas magnéticas podem inibir a amplificação, podendo

diminuir “a sensibilidade do PCR ou levar a resultados falsos negativos”. Por último, o eluído obtido é transferido automaticamente para uma placa de 96 poços, onde serão adicionados os reagentes para a reação de amplificação.

### **2.2.2. Amplificação e detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR**

A técnica de RT-PCR é uma técnica sensível, usada para detetar e quantificar RNA, sendo considerada a técnica padrão para detetar o novo SARS-CoV-2 (Mackay, 2004; Bustin e Mueller, 2005).

Após a preparação da placa de PCR no extrator, esta é transferida para o termociclador *Abbott m2000rt*, onde irá ocorrer a amplificação e detecção dos genes específicos e conservados do vírus. Para a detecção do genoma do SARS-CoV-2 são usados *primers* específicos do gene *RdRp* (RNA polimerase RNA dependente viral) e do gene *N* (da nucleocápside) (OMS, 2020; Vieira, Emery e Andriolo, 2020).

Os kits comerciais dos reagentes de amplificação contêm os materiais necessários para o procedimento RT-PCR, sendo eles a enzima termoestável DNA polimerase rTth, dNTPs, os *primers* complementares às sequências alvo do vírus e aos genes do CI e respetivas sondas. A DNA polimerase rTth, derivada da bactéria *Thermus thermophilus*, apresenta também atividade de transcriptase reversa quando na presença de iões de manganês (presentes no reagente de ativação do kit de amplificação), permitindo que o RT-PCR decorra numa única etapa (Sellner e Turbett, 1998; Myers e Gelfand, 1991 cit. por Cai *et al.*, 2018).

De um modo resumido, técnica de RT-PCR baseia-se na transcrição reversa pela polimerase rTth do RNA viral de cadeia simples numa cadeia complementar de DNA, o cDNA, seguido de amplificação exponencial deste, onde são produzidos milhares de cópias. No caso do RT-PCR em tempo real, a detecção dos produtos amplificados é feita à medida que são gerados ao longo do processo, através da detecção da fluorescência emitida por parte das sondas usadas (Mackay, 2004).

Após a transcrição reversa, o processo do PCR pode ser dividido em três etapas. Inicia-se com a fase de desnaturação, onde ocorre um aumento da temperatura, de modo a que as duplas cadeias de DNA se separem. Na segunda etapa, a etapa de hibridização, ocorre a ligação da sonda e do *primer* ao DNA. Por último, na fase de extensão, a polimerase rTth liga-se a esse *primer* e sintetiza uma cadeia complementar ao DNA, formando-se assim uma dupla cadeia de DNA. Este processo repete-se, duplicando a quantidade de DNA a cada ciclo. É de referir que a amplificação do gene do CI decorre simultaneamente e da mesma forma, mas com *primers* específicos para o CI.

Para detetar a amplificação, são então usadas sondas fluorescentes, nomeadamente sondas TaqMan. Estas sondas são oligonucleótidos sintéticos que se ligam especificamente a uma parte interna do gene alvo no cDNA. Contêm um fluoróforo na extremidade 5' (“repórter”) e um *quencher* (“silenciador”) na extremidade 3'. Enquanto a sonda permanecer intacta, não há emissão de fluorescência, pois o *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo fluoróforo. (Espy *et al.*, 2006). No decorrer da fase de extensão, a sonda é degradada através da atividade exonuclease de 5' para 3' da polimerase rTth (Bustin e Mueller, 2005; Haas e Torres, 2006). Esta separação física do fluoróforo do *quencher* faz com que haja emissão de fluorescência por parte do fluoróforo quando este é excitado por um comprimento de onda específico, levando a um aumento exponencial da intensidade da fluorescência a cada ciclo de amplificação (Novais e Pires-Alves, 2004).

A sonda TaqMan só emite fluorescência quando sofre hibridização com a respetiva sequência complementar, fazendo com que seja mais sensível e mais específica em relação a outras sondas, como por exemplo as sondas SYBR Green, que são sensíveis, mas não específicas (Bustin e Mueller, 2005; Espy *et al.*, 2006).

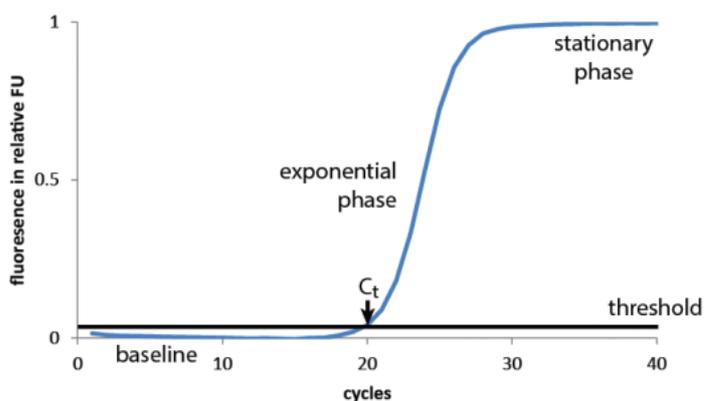
As sondas usadas para o CI contêm um fluoróforo que emite fluorescência a um comprimento de onda diferente, permitindo assim distinguir visualmente os produtos amplificados dos genes virais dos do CI.

### 2.3. Interpretação e validação dos resultados

Após o processo de RT-PCR, é necessário interpretar os gráficos obtidos, analisando um a um as curvas de amplificação do CI, dos controlos positivo e negativo e das amostras. Para tal, há que observar o *Cycle Threshold* ( $C_t$ ) de cada amostra, como exemplificado na Figura 3. O  $C_t$  é o número do ciclo no qual o sinal de fluorescência ultrapassa a “*Threshold line*” (linha limite) que indica o nível

basal a partir do qual se considera deteção de fluorescência (Public Health England, 2020). O  $C_t$  pode ser usado como uma medida semi-quantitativa da carga viral (Singanayagam *et al.*,

2020), pois está inversamente relacionado com a quantidade inicial de alvo. Sendo que neste



**Figura 3** – Exemplo de um gráfico de RT-PCR. Retirado de PCR Compendium: “Real-Time PCR” [Imagem] <https://pcrcompendium.wordpress.com/realtimepcr/> [28 de Março de 2021].

caso, o RT-PCR efetuado no LACUC tem no máximo 40 ciclos, um Ct baixo significa uma maior carga viral, pois foi preciso menos ciclos de amplificação para detetar fluorescência. Um Ct alto, por sua vez, será o inverso, em que foram necessários mais ciclos para haver detecção da fluorescência, revelando a presença de uma carga viral baixa.

A amplificação das amostras e dos controlos positivo e negativo, é observada em conjunto com o CI, que aparecem no gráfico a cores diferentes. O CI deve aparecer sempre amplificado, em todos os poços, garantindo a validação dos resultados. Uma falha no CI, no controlo positivo ou negativo implica a repetição da análise para todas as amostras. Amplificação no controlo negativo e/ou no tubo com água poderá ser indicador de contaminação.

Os gráficos das amostras são analisados um a um, confirmando-se se há amplificação ou não (Figura 4). Posteriormente, as Diretoras Técnicas validam e assinam o boletim de resultados, atendendo ao historial laboratorial e clínico (se disponível). Este é depois enviado para o utente, médico ou para as autoridades de saúde e é de notificação obrigatória, assegurando assim a vigilância e monitorização epidemiológica do país.



**Figura 4** - Exemplos de gráficos obtidos no RT-PCR de amostras analisadas no LACUC. À esquerda uma amostra negativa, cuja única amplificação detetada foi a do CI (curva azul). À direita uma amostra positiva (curva vermelha). Fonte: LACUC.

### 3. Controlo de qualidade

O controlo de qualidade é essencial nos serviços laboratoriais clínicos, visto que é de extrema importância que sejam entregues resultados fidedignos, consistentes, precisos e exatos, atendendo a vários requisitos de qualidade.

A constante melhoria dos serviços e dos processos analíticos realizados pelo laboratório, bem como a monitorização de possíveis falhas, de modo a evitar a sua ocorrência, devem ser uma das prioridades dos laboratórios de análises clínicas (Chaves, 2010). Erros em qualquer das fases do procedimento analítico podem ter um grande impacto na vida dos

doentes, nomeadamente no diagnóstico e posterior tratamento das suas doenças. Os erros também levam a um consumo de tempo e recursos, sendo outro dos impactos mais relevantes.

O controlo de qualidade pode ser dividido em controlo de qualidade interno (CQI) ou externo (CQE). O CQI é realizado através do uso de controlos internos (Martelli, 2011), normalmente fornecidos pelos *kits* do fabricante. No CQE há uma comparação de resultados de determinada amostra entre diferentes laboratórios, o que possibilita uma autoavaliação por parte de cada laboratório das suas boas práticas laboratoriais. Vieira (2011) cit. por Santos *et al.* (2020) considera que estes dois tipos de controlo de qualidade são importantes e que “*ambos se complementam, sendo essenciais para a segurança dos resultados*”.

### **3.1. Controlo de Qualidade Interno**

Para o ensaio do SARS-CoV-2 é usado um controlo positivo, um controlo negativo e um CI, fornecidos pela empresa *Abbott Laboratories* (a mesma dos aparelhos que o laboratório possui), que vêm em *kits*, juntamente com as cassetes de amplificação. O controlo positivo contém genes do SARS-CoV-2 e serve como controlo de amplificação ao permitir ao operador certificar-se que estes estão de facto a ser amplificados e detetados pelo equipamento. Já o controlo negativo não contém genes nenhuns e é usado como controlo de contaminação, não devendo aparecer amplificado. Ambos são analisados em paralelo com as amostras dos doentes e processados de igual forma.

O CI é uma sequência de um gene de abóbora (*Curcubita pepo*) em plasma humano negativo e é misturado com um dos reagentes necessários para a extração viral, que, durante esse processo, é adicionado a todas as amostras dos doentes. Este é também amplificado na mesma reação, apesar de não estar relacionado com vírus em questão (Mackay, 2004; Andreychuk *et al.*, 2019).

A visualização da amplificação do CI é assegurada por um fluoróforo diferente daquele dos genes do SARS-CoV-2 e tem de aparecer em todas amostras, demonstrando assim que não há erros no processo de amplificação e que o processo de extração do RNA viral, bem como a análise feita pelo termociclador decorreram corretamente, permitindo a validação dos resultados.

### **3.2. Avaliação Externa da Qualidade**

De acordo com Libeer (2001), a avaliação externa da qualidade é uma ferramenta importante para a gestão de qualidade de um laboratório. Este tipo de avaliação é inter-laboratorial, ou seja, uma dada amostra é enviada por uma entidade externa a diferentes laboratórios que trabalham, por exemplo, com métodos iguais ou até mesmo diferentes, e

que a analisam para uma subsequente comparação de resultados (Henry, 1999 cit. por Martelli, 2011), permitindo avaliar a exatidão destes.

No caso do LACUC, são enviadas pela entidade externa *LabQuality* (através do Instituto Ricardo Jorge) zaragoas, que são colocadas primeiramente em meio de transporte, sendo depois processadas da mesma maneira que uma amostra comum. Os resultados são posteriormente enviados à *LabQuality*, que os avalia e os compara com outros laboratórios participantes no mesmo programa de avaliação externa de qualidade.



## **Capítulo II**

### **Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG**



## **I. Caracterização do Laboratório**

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) deu início à sua atividade em 1953 e é uma importante unidade hospitalar da Região Centro que integra o Sistema Nacional de Saúde, especializada no diagnóstico e tratamento das doenças oncológicas. Nesta instituição está integrado o Serviço de Patologia Clínica (SPC), situado no piso 0 do edifício de Oncologia Médica, que conta com a Direção Técnica do Dr. Luís do Espírito Santo Nina, médico especialista em Patologia Clínica.

A equipa que trabalha no SPC é constituída por médicos especialistas, médicos internos de especialidade, técnicos superiores de saúde (biólogos, farmacêuticos e bioquímicos), técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica (TSDT), pessoal administrativo e auxiliar. A componente laboratorial compreende cinco setores, nomeadamente a Hematologia, a Microbiologia, a Química Clínica, a Imunologia/Hormonologia e a Virologia. Este último setor foi inaugurado em fevereiro de 2021 para diagnóstico e rastreio da COVID-19. O SPC conta também com uma sala de espera, uma sala de colheitas e uma receção/área administrativa, onde os doentes são recebidos e os pedidos de análises, acompanhados pela requisição médica, são registados no sistema informático *Modulab*. As colheitas das amostras no próprio SPC estão a cargo dos TSDT, que também realizam as colheitas dos doentes que estão no internamento e no ambulatório. Em média, o laboratório recebe e regista cerca de 400 a 500 amostras diárias.

## **2. Fase Pré-Analítica**

A fase pré-analítica compreende todos os procedimentos anteriores à análise da amostra, começando na requisição das análises pelo clínico, receção e preparação do doente e terminando na colheita dos produtos biológicos, transporte (quando necessário) e triagem das amostras. Apesar de não ter participado muito nesta fase, é importante dar o devido valor e atenção, pois a maioria dos erros em laboratórios de análises clínicas ocorrem na fase pré-analítica devido ao facto de ter muitos procedimentos manuais que podem gerar consequências, tanto na qualidade da análise como para o paciente (Guimarães *et al.*, 2011; Lippi *et al.*, 2015).

Segundo Lippi *et al.* (2015), alguns erros pré-analíticos são por exemplo a falta de ou a incorreta identificação da amostra, proporção inadequada de amostra e anticoagulante, amostras coaguladas, hemolisadas ou com volume insuficiente ou até condições de transporte e armazenamento inapropriadas. Um laboratório pode ser dotado de bons equipamentos, que

sejam rápidos e precisos, mas sem uma amostra em boas condições não há como obter resultados fidedignos.

Os erros pré-analíticos não só levam a um consumo de recursos e de tempo como por vezes podem levar à perda definitiva da análise porque nem sempre é fácil repetir uma colheita, uma vez que os doentes do IPOCFG estão fragilizados, não só pelas suas patologias, como pelos tratamentos agressivos a que estão sujeitos. A minimização dos erros nesta fase é, portanto, crucial, devendo-se implementar estratégias de controlo de qualidade que devem ser seguidas por todos com muito rigor (Guimarães *et al.*, 2011).

### 3. Setor de Química Clínica

No setor de Química Clínica são determinados, maioritariamente, parâmetros considerados de rotina, que permitem avaliar a função renal, hepática, pancreática, o equilíbrio eletrolítico e diferentes metabolitos, acompanhando assim o estado de saúde dos doentes que estão, por exemplo, em fase de tratamento, em pré- e pós-operatório e também em consultas de seguimento (“*follow-up*”).

A amostra mais comum é o soro, obtido após a coagulação do sangue e posterior centrifugação. O tubo de colheita para o soro contém pequenas esferas de sílica que promovem a coagulação. O segundo tipo de amostra mais comum é o sangue total, colhido para uma seringa com anticoagulante para determinar o cálcio ionizado. O setor recebe também outros tipos de amostras (embora menos frequentes), como por exemplo: sangue total em tubo com EDTA para determinação da hemoglobina glicada, sangue total arterial colhido numa seringa com anticoagulante para gasometrias, urinas (ocasionais ou de 24 horas) e outros líquidos biológicos como líquidos de drenos e líquido cefalorraquidiano (LCR).

Os equipamentos existentes neste sector e as respetivas funções, métodos e análises que efetuam, estão descritos na Tabela I. O setor conta também com duas centrífugas e quatro computadores.

De referir que são também realizadas neste setor, com muito pouca frequência, algumas técnicas manuais de aglutinação, que se baseiam na reação antigénio-anticorpo, cuja leitura e interpretação de resultados é feita macroscopicamente. Determina-se a presença de fatores reumatóides (teste de Waaler-Rose), anticorpos contra *Salmonella spp.* (teste de Widal), *Brucella spp.* (teste de Wright ou Rosa de Bengal) e despiste de sífilis (teste VDRL).

Neste setor tive a oportunidade de me integrar no fluxo de trabalho, nomeadamente na receção e centrifugação das amostras e colocação destas nos respetivos aparelhos, observação de algumas técnicas manuais, do controlo interno e externo de qualidade (bem como o envio de resultados) e ainda preparação de amostras para diferentes ensaios clínicos.

**Tabela I** - Equipamentos e respetivos métodos de análise, funções e parâmetros analisados do setor de Química Clínica do SPC-IPOCFG.

Equipamento	Método de análise	Funções	Parâmetros avaliados
<i>Atellica CH Analyzer</i> da <b>Siemens Healthineers</b> <sup>®</sup>	Espetrofotometria e Potenciometria indirecta (ionograma)	Determinação de parâmetros bioquímicos	Exemplos: Ureia, glicose, creatinina, magnésio, fósforo, proteínas totais, albumina, ácido úrico, bilirrubina total e direta, colesterol total, ferro, ionograma etc.
<i>ABL 800 FLEX</i> da <b>Radiometer</b> <sup>®</sup>	Potenciometria directa	Determinação do cálcio ionizado e diferentes gases no sangue (gasometrias)	- K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> - Glucose, Lactato - pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> - Hemoglobina, saturação de oxigénio e frações da hemoglobina
<i>Reflotron</i> da <b>Roche Diagnostics</b> <sup>®</sup>	Refratometria	Confirmação de resultados de certos parâmetros obtidos no <i>Atellica CH</i>	
<i>RapidChem 744</i> da <b>Siemens</b> <sup>®</sup>	Potenciometria directa	Confirmação de resultados do <i>Atellica CH</i> (ionograma)	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>

#### 4. Setor de Imunologia/Hormonologia

O setor de Imunologia/Hormonologia é um dos maiores setores do SPC bem como um dos mais automatizados. Os parâmetros aqui analisados são variados: marcadores tumorais e hormonas, auto-anticorpos; fármacos; marcadores cardíacos; e anticorpos/antígenos específicos. A grande maioria são determinados por imunoensaios, onde ocorre a formação de complexos antígeno/anticorpo, sendo utilizados métodos competitivos ou em *sandwich*, cujo método de deteção é diferente de aparelho para aparelho.

O soro é a amostra mais utilizada, sendo também recebidas amostras de sangue total com EDTA e com heparina (para obtenção do plasma) e urinas (pontuais e de 24 horas).

Ao contrário dos outros setores, aqui as amostras percorrem um circuito específico devido à variedade de parâmetros e de equipamentos. Devido ao facto de os equipamentos não estarem interligados entre si e por uma questão de organização, a ordem das análises está especificada na etiqueta de identificação da amostra, que contém as abreviaturas dos diferentes equipamentos pelos quais a amostra tem de passar, evitando assim repetições de análises. Alguns equipamentos e os respetivos métodos e análises que efetuam, estão no Anexo I.

Neste setor são também feitas técnicas eletroforéticas no analisador *Hydrasys 2* (da *Sebia*) que realiza e analisa proteinogramas, eletroforese das isoenzimas da fosfatase alcalina, proteína de *Bence-Jones* urinária e imunofixação para detecção de imunoglobulinas monoclonais.

O auto-analisador *Viva-E* (da *Siemens*) doseia certos fármacos/antibióticos por ensaios imunoenzimáticos competitivos, sendo frequente a determinação das concentrações pico e vale de antibióticos como a amicacina ou a vancomicina.

Adaptado à nova realidade que vivemos, o equipamento *Euroimmun Analyzer I-2P* (da *Euroimmun AG*) deteta anticorpos anti-SARS CoV 2 (IgM e mais frequentemente IgG) através de imunoenaios enzimáticos indiretos.

Contudo, neste sector também se realizam algumas técnicas manuais, as quais pude acompanhar e realizar: determinação do iodo e do ácido vanilmandélico na urina, cuja detecção é feita por um *ELISA reader* ou por espectrofotometria, respetivamente; quantificação de metanefrinas e normetanefrinas urinárias (metabolitos da epinefrina e da norepinefrina respetivamente), 3-metoxitiramina plasmática (metabolito da dopamina) e 17-alfa-hidroxiprogesterona (no soro) por imunoenaios competitivos com recurso a radioisótopos (iodo-125), cujos resultados são obtidos com o contador de radiação gama *Wizard 1470 Gamma Counter* (da *Wallac*).

Neste setor tive a oportunidade de me integrar no fluxo de trabalho, onde aprendi o circuito, fiz a receção e centrifugação das amostras e observei/realizei as técnicas manuais e eletroforéticas aqui mencionadas.

## **5. Setor de Hematologia**

A hematologia é a ciência que se dedica ao estudo do sangue, nomeadamente das células que o compõem, as suas funções e estruturas, dos órgãos que produzem essas células e das patologias associadas (McKenzie e Williams, 2015).

No setor de Hematologia procede-se, sobretudo, à análise de amostras de sangue total e esfregaços de sangue periférico que podem fornecer informações relevantes sobre o estado do doente. É necessário determinar e avaliar diferentes parâmetros que dão informações sobre os componentes celulares sanguíneos e examinar a morfologia celular.

São também realizados neste setor outros testes mais complexos (embora com muito menor frequência) como a imunofenotipagem por citometria de fluxo, pesquisa do gene BCR-ABL por técnica de PCR e a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

O setor de Hematologia conta com diferentes equipamentos que estão listados na Tabela II.

**Tabela II** - Equipamentos e respetivas funções do setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

<b>Equipamento</b>	<b>Funcionalidade</b>
DxH900 Analyzer da <b>Beckman Coulter</b> ®	Hemograma, contagem diferencial de leucócitos e contagem de reticulócitos.
Test I BCL da <b>AliFax</b> ®	Velocidade de sedimentação (VS).
Aerospray HematologyPro Cytocentrifuge da <b>Wescor</b> ®	Coloração de esfregaços sanguíneos e de aspirados de medula óssea.
ACL TOP® CTS 350 da <b>Instrumentation Laboratory</b>	Estudos da hemóstase.
Cytomics FC <sub>500</sub> da <b>Beckman Coulter</b> ®	Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo.
GeneXpert da <b>Cepheid</b> ®	Pesquisa e quantificação do gene BCR-ABL por técnica de PCR.
Microscópio de fluorescência da <b>Nikon</b> + programa informático de análise de imagens da <b>MetaSystems ISIS</b> ®	Técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).

O setor de Hematologia encontra-se dividido em duas salas: a sala principal, onde as amostras são recebidas (é feito scan da etiqueta da amostra com registo no sistema informático), onde se encontra os equipamentos que realizam os hemogramas, a velocidade de sedimentação (VS), a coloração de esfregaços sanguíneos e de aspirados de medula óssea e também o microscópio ótico para a observação dos esfregaços; na outra sala encontram-se os equipamentos que efetuam as provas de coagulação. O setor tem também um agitador de amostras, um contador manual de células sanguíneas e duas centrífugas.

As amostras mais frequentes e respetivas análises do setor de Hematologia estão descritas na Tabela III. Com muito menor frequência chegam também ao setor amostras de aspirados de medula óssea para a realização de medulogramas, onde é necessário efetuar esfregaços e proceder à sua coloração.

**Tabela III** - Amostras mais frequentes e respectivas análises do setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

Amostra	Tubo de colheita	Anticoagulante	Análises
Sangue Total		EDTA tripotássico	Hemograma Velocidade de sedimentação Estudos morfológicos
Plasma (obtido após centrifugação)		Citrato de sódio	Provas de coagulação

Fotos tiradas no SPC- IPOCFG.

Durante o meu estágio neste setor fiz a receção das amostras e o seu processamento, efetuei esfregaços sanguíneos manualmente, avaliei a morfologia e fiz contagens de leucócitos.

## 5.1. Hemograma

O sangue é constituído por diversas células sanguíneas suspensas num meio fluído, o plasma, que constitui 55 a 66% do volume total do sangue (Celkan, 2020). Todas as células sanguíneas que circulam no sangue derivam de células estaminais pluripotentes, presentes na medula óssea e dividem-se em três grandes tipos: os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos (e posteriormente em subpopulações) e as plaquetas (Figura 5) (Hoffbrand e Moss, 2016).

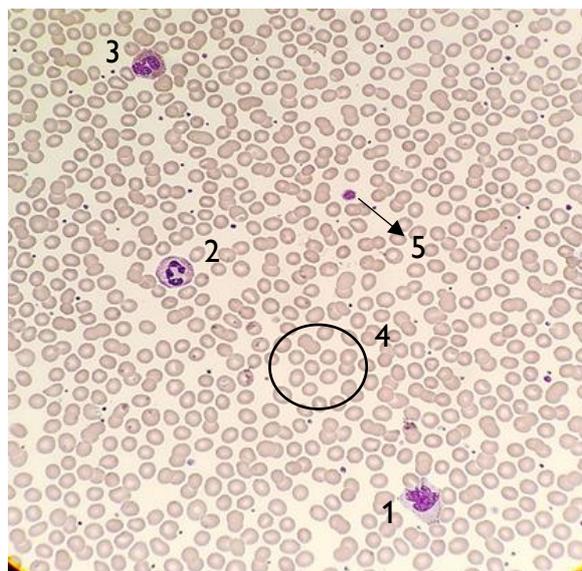
O hemograma é o exame laboratorial mais comum e apresenta diversos parâmetros que nos dão informações sobre as diferentes células sanguíneas, tais como a quantidade, tamanho ou percentagens de cada população, permitindo estabelecer um possível diagnóstico e prognóstico de certas patologias (Butrago, 2015; Celkan, 2020).

Como descrito anteriormente (Tabela III), para o hemograma é usado sangue total colhido num tubo com EDTA tripotássico. O EDTA é o anticoagulante padrão para o hemograma, atuando como um quelante dos iões de cálcio, necessários para o processo da coagulação (Alemu *et al.*, 2006).

O EDTA ajuda também na preservação dos componentes celulares e não afeta a morfologia das células (Banfi *et al.*, 2007).

No setor de Hematologia os hemogramas são efetuados no autoanalisador *DxH900*, que utiliza o princípio de Coulter, a tecnologia Volume, Condutividade, Dispersão da luz (do inglês *Volume-Conductivity-Light Scatter: VCS*) e a espectrofotometria.

O **princípio de Coulter** é o método mais comum usado pelos auto-analisadores para contar células (Wahed *et al.*, 2020). O princípio baseia-se na detecção e medição das alterações na corrente elétrica geradas pela passagem de cada célula por um pequeno orifício num líquido condutor (Greer *et al.*, 2003). Em cada lado do orifício encontram-se



**Figura 5** - Alguns tipos de células sanguíneas. 1 - Monócito; 2 - Neutrófilo; 3 - Basófilo; 4 - Eritrócitos; 5 - Plaqueta. Os números 1 a 3 pertencem às subpopulações de glóbulos brancos.  
Fonte: Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

dois eletrodos de platina que estabelecem entre si uma corrente elétrica constante. À medida que cada célula passa individualmente pelo orifício, produz uma alteração na impedância, ou seja, alteram o fluxo da corrente elétrica entre os eletrodos, gerando um impulso elétrico mensurável, cuja amplitude é proporcional ao volume da célula e o número de impulsos indica o número de partículas (Greer *et al.*, 2003; Briggs e Bain, 2017).

Com este método é possível obter contagens dos eritrócitos (RBC), das plaquetas (PLT) e dos leucócitos (WBC), processo que começa com a contagem das duas primeiras linhas celulares num compartimento do equipamento, seguido da lise dos eritrócitos e contagem dos leucócitos num compartimento distinto. O equipamento considera como plaquetas as células com tamanhos entre 2-20 fentolitros (fL), como eritrócitos as células com tamanhos entre 36-360 fL e os leucócitos com tamanhos superiores a 35 fL.

Os resultados das contagens são obtidos por um osciloscópio, que conta e regista o número de impulsos e os traduz num histograma, cujo eixo do x representa o tamanho da célula (fL) e o eixo dos y o número de células que foram contadas (histograma de distribuição do tamanho) (Wahed *et al.*, 2020). Deste modo, obtém-se três histogramas: o plaquetar, o eritrocitário e o leucocitário (Figura 6).

O histograma eritrocitário fornece duas informações, nomeadamente o volume médio dos eritrócitos (VCM) e a amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW). O pico da curva do histograma deverá estar entre os valores de referência do VCM, que no caso do SPC se situa entre os 85 e os 95 fL. O VCM dá informações sobre o tamanho dos eritrócitos, sendo um parâmetro importante na classificação das anemias (Celkan, 2020). O RDW funciona

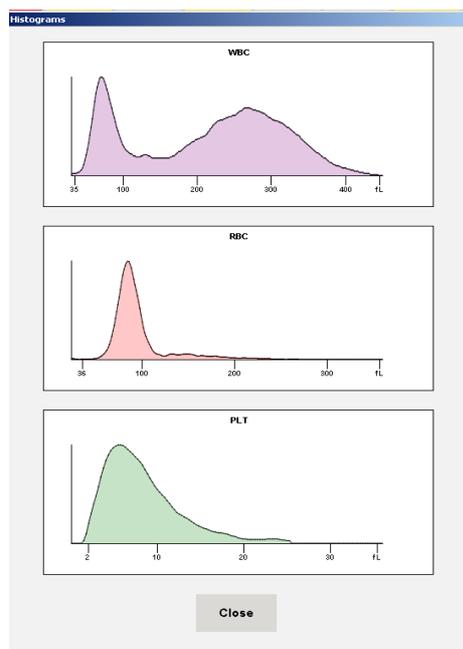
como um índice de anisocitose eritrocitária (variação do tamanho), em que a heterogeneidade na distribuição do tamanho dos eritrócitos é observada sob a forma de percentagem da variação dos volumes obtidos (Wahed *et al.*, 2020; Celkan 2020).

O histograma plaquetário fornece informações sobre o volume plaquetar médio (VPM) e a amplitude de distribuição das plaquetas (PDW) (Wahed *et al.*, 2020). O plaquetócrito, que corresponde à percentagem do volume de plaquetas sobre o volume total de sangue, é calculado pelo equipamento a partir do VPM e da contagem total das plaquetas.

A **tecnologia VCS** baseia-se em três medições: volume da célula; condutividade; e dispersão de uma luz laser (dispersão esta que é diferente conforme o tipo de célula). É usada para obter a forma leucocitária (contagem e diferenciação das diferentes populações de leucócitos), a contagem de reticulócitos (glóbulos vermelhos imaturos) e de eritroblastos (precursores nucleados dos eritrócitos).

O volume da célula é determinado usando o princípio de Coulter. Para a condutividade é utilizada uma corrente eletromagnética de alta frequência que atravessa as células e avalia a composição interna (relação núcleo/citoplasma, densidade nuclear, etc.) e química. Por último, a passagem das células por um feixe de luz laser, que sofre dispersão e é detetado por sensores em cinco ângulos diferentes, permite avaliar a granularidade citoplasmática e a estrutura nuclear (Bacall, 2009; Virk *et al.*, 2018; Shrivastava *et al.*, 2018). Todos estes dados permitem diferenciar os leucócitos em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos e obter as percentagens de cada um e os respetivos valores absolutos. Os dados obtidos são expressos em gráficos bi- e tridimensionais.

Por último, a **espectrofotometria** é usada para medir a concentração de hemoglobina, sendo primeiro necessário a lise dos eritrócitos para a sua libertação (Briggs e Bain, 2017; Celkan, 2020). Com a adição de um reagente da casa comercial, a hemoglobina é convertida num pigmento estável que é medido a 525nm. A absorvância do pigmento será diretamente proporcional à concentração de hemoglobina na amostra (McCall, 1956).



**Figura 6** - Representação gráfica dos histogramas obtidos pelo auto-analisador DxH900. O histograma a roxo representa o leucocitário, a vermelho está representado o histograma eritrócitário e a verde o plaquetar. Fonte: Beckman Coulter.

Com a concentração de hemoglobina, o equipamento calcula automaticamente os restantes parâmetros do eritrograma, nomeadamente o hematócrito, a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração corpuscular média de hemoglobina (CHCM).

### **5.1.1. Alterações mais comuns no hemograma**

Durante o meu estágio no setor de Hematologia, observei diariamente hemogramas que apresentavam uma ou mais alterações, nomeadamente anemias, trombocitopenias e neutropenias. É de salientar que o IPO é um hospital para doentes oncológicos e como tal, pacientes que estão a realizar tratamentos muito agressivos como quimioterapia ou radioterapia.

Infelizmente, os medicamentos usados, por exemplo na quimioterapia, não possuem especificidade e afetam, tanto as células cancerígenas como células saudáveis, especialmente aquelas que apresentam elevada atividade mitótica e rápida proliferação celular (Riul e Aguillar, 1999; Fonseca *et al.*, 2000 cit. por Andrade *et al.*, 2018). Como consequência verifica-se o aparecimento de efeitos colaterais ao longo do tratamento, nomeadamente toxicidade hematológica, com o aparecimento frequente de anemias, trombocitopenias e neutropenias (Montoya, 2007; Dickens e Ahmed, 2017).

#### **Anemia**

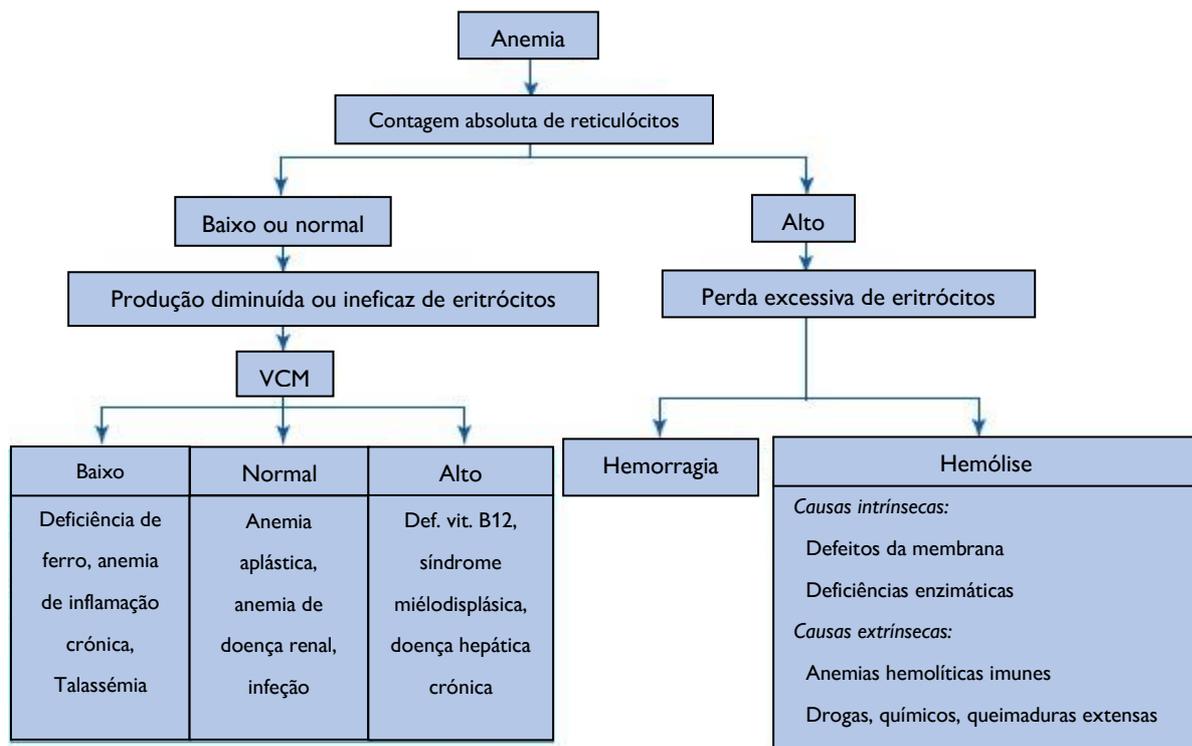
A anemia é uma alteração muito comum com diversas etiologias. É definida como uma diminuição do número de eritrócitos e/ou na concentração de hemoglobina, cujos valores variam conforme o sexo e a idade (McKenzie e Williams, 2018). A OMS considera anemia valores de hemoglobina abaixo dos 12g/dL para mulheres e das 13g/dL para homens.

No IPO é muito frequente os doentes serem anémicos, quer seja devido aos tratamentos a que estão sujeitos, quer seja devido às suas patologias de base, pelo que se deve ter em atenção o histórico clínico do paciente.

Através do hemograma é possível então identificar uma anemia observando o valor dos eritrócitos e a concentração de hemoglobina e também classificá-la morfológicamente usando os índices eritrocitários VCM e HCM (McKenzie e Williams, 2015). Em termos práticos, o VCM permite classificar a anemia conforme o tamanho dos eritrócitos em microcítica (pequenos), normocítica (tamanho normal) e macrocítica (maiores que o normal) (Hoffbrand e Moss, 2016). O HCM dá informações sobre a quantidade de hemoglobina nos eritrócitos, que morfológicamente se traduz numa tonalidade vermelha mais pálida ou mais carregada.

Estas informações, embora pareçam simples, podem dar pistas sobre a possível causa da anemia (Figura 7), sobretudo se combinadas com outros parâmetros do hemograma como o RDW ou outros parâmetros, como por exemplo a contagem de reticulócitos, a bilirrubina indireta, a ferritina, o ácido fólico e a vitamina B12 (Lin, 2018).

A contagem de reticulócitos é útil para avaliar o grau de produção de eritrócitos, denominada eritropoiese (McKenzie e Williams, 2015). Em resposta a uma anemia, uma eritropoiese eficaz por parte da medula óssea traduz-se num aumento do número de reticulócitos no sangue, mostrando assim a sua capacidade em produzir novas células em casos de hemorragias, anemias hemolíticas ou suplementação (Lin, 2018). Quando o número de reticulócitos é baixo, estamos na presença de uma anemia hiporegenerativa, que indica uma diminuição na produção de eritrócitos, como resultado de uma eritropoiese ineficaz ou insuficiente (Lin, 2018; McKenzie e Williams, 2015; Keohane *et al.*, 2020). Nestes casos torna-se útil avaliar o VCM e o HCM (Greer *et al.*, 2003) (Figura 7).



**Figura 7** - Possíveis causas de anemia baseadas na contagem de reticulócitos e no Volume Corpuscular Médio (VCM). Adaptado de Keohane *et al.*, 2020.

## Neutropenia

Os neutrófilos são das células mais frequentemente encontradas em circulação no sangue, representando cerca de 60% a 70% de todos os leucócitos num adulto pelo que a sua produção pela medula óssea é extensa (Bhatt e Saleem, 2004). São células muito importantes que fazem parte do sistema imunitário inato na defesa contra infeções e inflamações (Crawford *et al.*, 2003; Hassan *et al.*, 2015).

A neutropenia consiste na redução da contagem absoluta de neutrófilos no sangue, abaixo das 1500 células/ $\mu\text{l}$  (Hassan *et al.*, 2011; 2015), resultando de uma deficiência na produção de neutrófilos pela medula óssea (inibição direta) ou da sua destruição periférica (Bhatt e Saleem, 2004; McKenzie e Williams, 2015). Esta condição pode ser adquirida ou congênita, sendo que a adquirida é a mais comum e é devido sobretudo a medicamentos/drogas (Keohane *et al.*, 2020). Algumas outras causas de neutropenia estão descritas na Tabela IV.

A quimioterapia citotóxica afeta a divisão celular dos precursores dos leucócitos, suprimindo a produção de neutrófilos (Crawford *et al.*, 2003; 2013). Assim, a neutropenia é um dos efeitos secundários da quimioterapia (Hassan *et al.*, 2011). Isto condiciona o tratamento, pois a neutropenia deixa o doente mais suscetível

**Tabela IV** - Exemplos de causas de neutropenia. Adaptado de McKenzie e Williams, 2015.

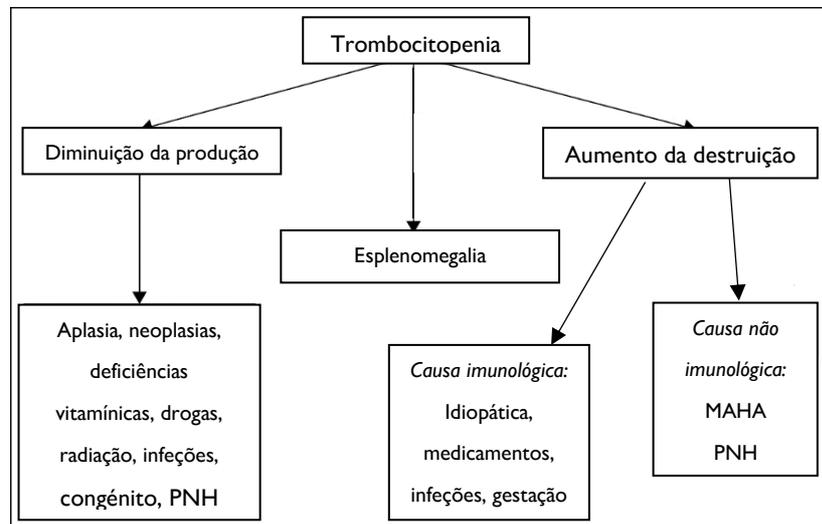
Causas de neutropenia	Exemplos
Infeções	Infeções virais e bacterianas (sépsis)
Agentes físicos e químicos	Radiação, benzeno
Drogas	Quimioterapia, anti-inflamatórios, antibacterianos etc.
Doenças hematológicas	Leucemia aguda, anemia megaloblástica e aplástica, esplenomegalia
Auto-anticorpos	Lúpus sistémico eritematoso

a infeções bacterianas e fúngicas (Bhatt e Saleem, 2004; McKenzie e Williams, 2015), dependendo da severidade e da duração da neutropenia (Sharma e Lokeshwar, 2005). Segundo Crawford (2004) e Hassan *et al.* (2015), a neutropenia é o maior fator limitante da quimioterapia, afetando a dose e a duração desta. A quimioterapia tem que ser reduzida ou interrompida caso haja desenvolvimento de neutropenia e febre (neutropenia febril).

## Trombocitopenia

As plaquetas resultam da fragmentação dos megacariócitos (células progenitoras) presentes na medula óssea e são essenciais para os processos de coagulação. A trombocitopenia é outra consequência da toxicidade hematológica que advém da quimioterapia e traduz-se por uma redução do número de plaquetas no sangue (<150,000 células/ $\mu\text{l}$ ), com conseqüente risco de hemorragia (Greer *et al.*, 2004; Razzaghdoust *et al.*, 2019).

Os mecanismos fisiopatológicos resultam, por exemplo, de uma produção insuficiente/deficiente de plaquetas na medula óssea, aumento da sua destruição ou de uma distribuição anormal (Greer *et al.*, 2004; Wahed *et al.*, 2020) (Figura 8). No caso dos agentes quimioterapêuticos, estes suprimem a produção de megacariócitos como também podem promover a apoptose das plaquetas, aumentar a sua destruição ou inibir a libertação destas dos megacariócitos (Kuter, 2015). Como tal, a trombocitopenia é outro fator que pode limitar também a dose e a frequência da quimioterapia e pode também impedir procedimentos cirúrgicos, devido à maior



**Figura 8** - Exemplos de causas de trombocitopenia, divididas conforme o mecanismo subjacente. MAHA: Anemia Hemolítica Microangiopática; PNH: Hemoglobinúria Paroxística Noturna. Adaptado de Devata, 2018.

probabilidade de ocorrer hemorragias (Hassan *et al.*, 2015; Weycker *et al.*, 2019).

Apesar de ser um grande problema em pacientes com cancro, devem também ser consideradas e excluídas outras etiologias (Kuter, 2015).

## 5.2. Velocidade de Sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação (VS) corresponde à velocidade com que os eritrócitos se depositam no plasma durante o período de 1 hora (Hoffbrand e Moss, 2016).

A sedimentação resulta do facto dos eritrócitos serem mais pesados que as outras células sanguíneas e à sua capacidade de formarem agregados dispostos em pilhas de moedas, conhecido como efeito *rouleaux*. Este efeito deve-se ao aumento de proteínas plasmáticas de elevada massa molecular, como por exemplo globulinas. Os eritrócitos apresentam carga elétrica negativa, o que faz com que haja repulsão entre eles. Com o aumento de proteínas plasmáticas, ocorre uma neutralização das cargas negativas dos eritrócitos, devido ao facto das proteínas plasmáticas apresentarem carga positiva. Isto impede assim a repulsão e consequentemente ocorre uma acentuada agregação dos eritrócitos, levando ao aumento da VS. Este aumento pode estar relacionado com estados inflamatórios, infecciosos ou neoplásicos, traumas e/ou cirurgias (Santos *et al.*, 2000; Cha *et al.*, 2009).

Para além da concentração das proteínas plasmáticas, a VS também depende da forma e o volume dos eritrócitos (Santos *et al.*, 2000).

A determinação da VS é feita no analisador automático *TEST 1 BCL* (da *AliFax*) e é usado sangue total com EDTA. O princípio de funcionamento do analisador automático baseia-se na fotometria cinética capilar. Usando um microfotómetro de infravermelhos e um detetor de fotodíodo, o sistema realiza 1000 leituras durante 20 segundos num comprimento de onda a 950nm quando a amostra é distribuída por um capilar. Com os impulsos elétricos detetados, estabelece-se uma correlação direta com a agregação dos eritrócitos presentes no capilar e é delineada uma curva de sedimentação e agregação para cada amostra. Através de um algoritmo matemático, o resultado é então emitido, expresso em milímetros por hora (Plebani *et al.*, 1998; Malin *et al.*, 2000; Cha *et al.*, 2009).

### **5.3. Esfregaço de sangue periférico e alterações morfológicas**

O esfregaço sanguíneo é uma das poucas técnicas manuais que se realiza no setor de Hematologia e a que mais teve oportunidade de executar. É um exame hematológico que pode ajudar o médico num diagnóstico diferencial, a monitorizar a progressão da doença e avaliar a resposta à terapêutica, pelo que a sua correta interpretação é importante (Adewoyin e Nwogoh, 2014).

É solicitado pelo médico ou pelos responsáveis do setor quando, após a obtenção do hemograma, se verificam algumas situações como agregados plaquetares, leucocitoses ou quando o aparelho *DxH900* sinaliza a presença de possíveis eritrócitos nucleados ou de células imaturas (blastos). Deste modo, um esfregaço bem feito pode fornecer muitas informações a nível da morfologia das três linhagens de células sanguíneas, possibilitando a observação de células atípicas (Tabela V).

Em pessoas saudáveis, os eritrócitos não apresentam grandes variações em termos de tamanho, forma e cor ao microscópio (Bain, 2017). Em pacientes com anemia, situação muito frequente no IPO, é importante avaliar bem os eritrócitos, pois estes, para além de serem as células mais frequentes, podem apresentar uma variedade de anomalias, dando pistas sobre a causa da anemia. Devemos então ter em conta cinco aspetos aquando da observação do esfregaço: cor, tamanho, forma, presença de inclusões e disposição dos eritrócitos (Ford, 2013; Wahed *et al.*, 2020).

De igual importância é também a avaliação da morfologia dos leucócitos e plaquetas, pois alterações na segmentação, tamanho, granulações ou na quantidade, podem estar também associadas a patologias (Tabela V).

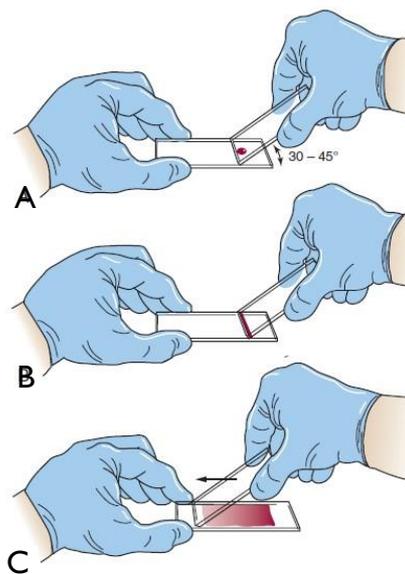
Para a preparação do esfregaço sanguíneo (Figura 9) é usado sangue com EDTA, em que uma pequena gota é colocada numa ponta da lâmina. Com o auxílio de uma outra lâmina, a gota de sangue deve espalhar-se uniformemente pela parte de trás da lâmina (Figura 9B). Por fim, com um movimento rápido e suave, a gota deve ser espalhada pela lâmina, obtendo-se um esfregaço (Figura 9C).

Após secagem do esfregaço, a coloração de *Wright-Giemsa* é feita automaticamente. Para esta coloração são usados dois corantes, o azul de metileno e a eosina, responsáveis por tornar as células mais visíveis, de modo a que a sua morfologia possa ser avaliada.

O azul de metileno é um corante básico que cora estruturas celulares acídicas, como o RNA, o núcleo, proteínas celulares acídicas, o citoplasma dos monócitos etc. (Woronzoff-Dashkoff, 2002). A eosina é um corante ácido com afinidade para estruturas e componentes celulares básicos como a hemoglobina e os grânulos dos eosinófilos (Woronzoff-Dashkoff, 2002; Keohane et al., 2020).

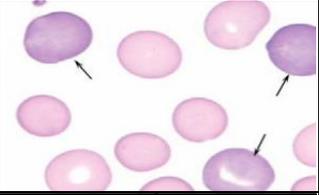
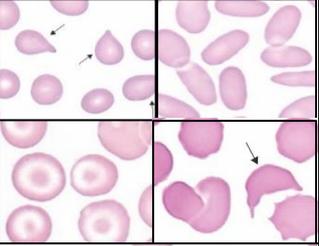
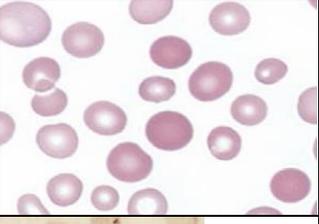
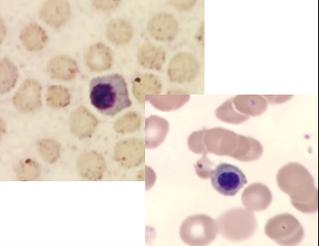
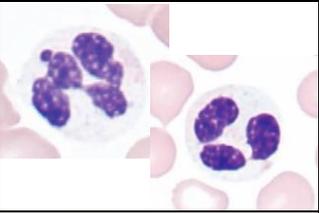
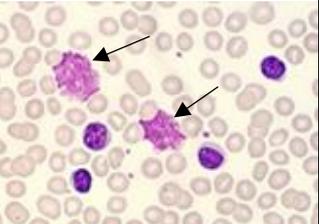
A observação do esfregaço é feita na objetiva de 50x com óleo de imersão, procurando uma zona em que os eritrócitos não estejam aglutinados, mas sim uniformemente distribuídos. A observação pode ser direcionada, conforme a requisição do médico ou de acordo com o hemograma obtido.

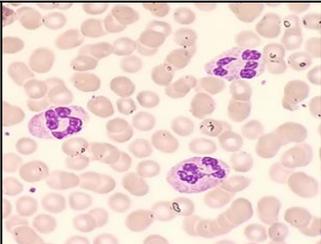
Durante as minhas observações, analisei e descrevi as três linhas celulares, sendo que a minha maior dificuldade foi em relação à identificação de células precursoras dos leucócitos. Quando necessário, é realizado também contagens diferenciais de leucócitos com o auxílio de um contador de células manual, onde são contadas e diferenciadas 100 células.



**Figura 9** - Representação gráfica da técnica de preparação manual de um esfregaço sanguíneo. Adaptado de Keohane et al., 2020.

**Tabela V** - Exemplos de algumas alterações morfológicas das células sanguíneas, descrição e imagens.

Alterações morfológicas	Descrição	Exemplos de condições clínicas associadas (Ford, 2013; Rodak e Carr, 2017; Keohane et al., 2020)	Visualização no esfregaço (Imagens retiradas do livro <i>Clinical Hematology Atlas</i> , 5 ed., 2017 e do setor de Hematologia SPC-IPOCFG)
<b>Linha eritrocitária</b>			
Policromasia	Variação da cor dos eritrócitos (presença de reticulócitos)	Durante o tratamento da anemia (se eficaz), hemorragias, anemia hemolítica	
Poiquilocitose	Variação na forma dos eritrócitos	Diferentes anemias, talassémias, síndromes mielodisplásicas, deficiências enzimáticas, hemoglobinopatias	
Anisocitose	Variação do tamanho numa população de eritrócitos	Anemia por deficiência de ferro, megaloblástica e hemolítica	
Eritroblastos	Células precursoras dos eritrócitos, que em situações fisiológicas normais não se encontram no sangue periférico	Metastização da medula óssea por tumores, algumas leucemias como a leucemia mielóide aguda, mielofibrose	
<b>Linha leucocitária</b>			
Hipogranulação	Diminuição ou ausência de grânulos específicos no citoplasma, diminuindo a sua cor	Neoplasias mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicas, infeções	
Manchas de Grumprecht	Linfócitos "frágeis" que se rompem ao realizar o esfregaço	Frequente na leucemia linfocítica crónica	

Hipersegmentação dos neutrófilos	Neutrófilos apresentam-se maiores do que os normais e têm mais do que 5 lóbulos	Anemia megaloblástica (mais frequente), síndromes mielodisplásicas, hipersegmentação congênita	
<b>Linha megacariocítica</b>			
Plaquetas gigantes	Plaquetas de tamanho superior ao normal	Síndromes mielodisplásicas, púrpura trombocitopênica imune, mielofibrose	

## 5.4. Avaliação Laboratorial da Função Hemostática

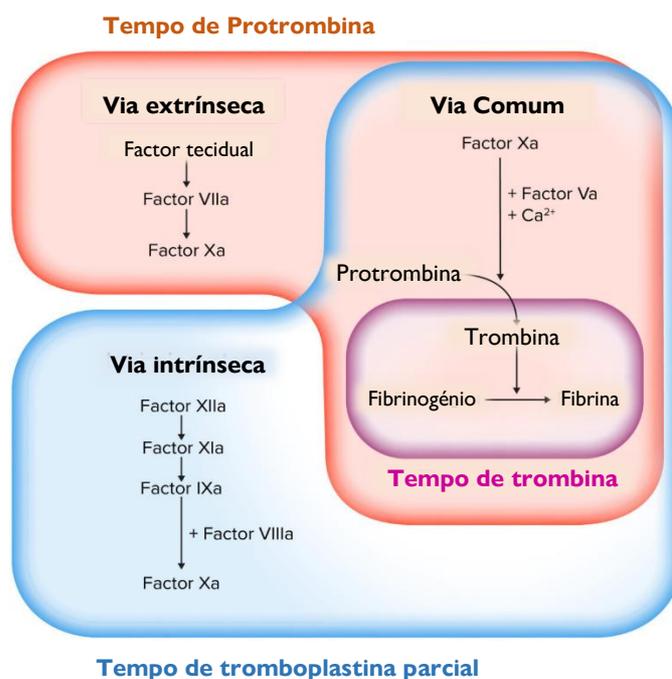
O sistema hemostático é essencial para proteger o sistema vascular de lesões que possam ocorrer, formando um coágulo de fibrina no local da lesão, assegurando assim a integridade dos vasos e limitando a perda de sangue. Dos constituintes deste sistema fazem parte as plaquetas, os vasos, anticoagulantes presentes no organismo, diversos fatores de coagulação e o sistema fibrinolítico, que apresentam complexas interações entre si para garantir o equilíbrio entre estancar a hemorragia, confinar o coágulo ao local da lesão e degradá-lo quando necessário (Palta *et al.*, 2014; Keohane *et al.*, 2020). Um desequilíbrio neste sistema pode levar a um maior risco trombótico ou hemorrágico, podendo o doente correr risco de vida.

Para a avaliação dos diversos parâmetros da coagulação, as amostras de sangue são colhidas para um tubo com citrato de sódio (anticoagulante, quelante de íons de cálcio) e processadas no equipamento *ACL TOP 350* (da *Instrumentation Laboratory*), que usa a técnica de turbidimetria para detetar a formação do coágulo. Este é detetado através de uma mudança na densidade ótica da amostra, que aumenta à medida que o coágulo se forma, conseqüentemente levando a uma diminuição da intensidade do feixe de luz que é transmitido. Esta diminuição é detetada num determinado período de tempo (segundos), que corresponderá ao tempo que demora a formar o coágulo na amostra (Aggarwal *et al.*, 2014).

### 5.4.1. Parâmetros de rotina

O modelo da cascata de coagulação explica, de um modo geral, as reações que ocorrem “*in vitro*” aquando do processo de formação de um coágulo (Figura 10).

Classicamente, este modelo é dividido em via intrínseca e via extrínseca, convergindo por fim na via comum, culminando com a formação de um coágulo de fibrina, sendo que “*in vivo*” estas reações ocorrem simultaneamente. A via intrínseca é iniciada por contacto com alguma superfície carregada negativamente, sendo que todos os fatores necessários à coagulação estão presentes no sangue. A via extrínseca é dependente do fator tecidual, presente nos vasos sanguíneos, sendo ativada na sequência de uma lesão vascular com a exposição do fator tecidual (Franco, 2001).



**Figura 10** - Representação da cascata da coagulação “*in vitro*” com as diferentes vias e respetivos testes de avaliação. Adaptado de Lecturio: “Assesing the coagulation cascade” [Imagem] <https://www.lecturio.com/concepts/coagulation-studies/> [8 de Julho de 2021].

Os parâmetros de rotina, ou de *screening*, mais realizados no SPC incluem o tempo de protrombina (TP), que avalia a via extrínseca e a comum, o tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) que avalia a via intrínseca e também a comum e o tempo de trombina (TT), que avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina (formação do coágulo). Anormalidades nalgum destes parâmetros requerem testes adicionais para melhor investigação do problema (McKenzie e Williams, 2015).

## Tempo de Protrombina (TP)

O TP (Figura 10) é um importante teste de *screening*, usado para detetar défices de fatores de coagulação (coagulopatias) ou para monitorização de terapêutica anticoagulante (Levy *et al.*, 2014; Keohane *et al.*, 2020).

O TP avalia o tempo necessário (em segundos) para que um coágulo se forme após a adição de fator tecidual, tromboplastina e cálcio à amostra do paciente, iniciando assim a via extrínseca. De um modo resumido, esta via começa) com a ativação do fator VII, que ativa o fator X, que por sua vez irá fazer com que a protrombina se converta em trombina e que esta atue sobre o fibrinogénio, originando fibrina.

Devido à existência de reagentes com diferentes tromboplastinas (sintéticas ou de animais) produzidas por diferentes fabricantes, a determinação de intervalos terapêuticos dos

anticoagulantes como a varfarina ou outros antagonistas da vitamina K era limitante, pois as diferentes tromboplastinas apresentam diferentes sensibilidades em relação às deficiências em fatores de coagulação, variando assim os valores de TP (Levy et al., 2014; Tripodi et al., 2016). Para minimizar essas variabilidades, a OMS desenvolveu e implementou um sistema de padronização, o *International Normalized Ratio* (INR) e propôs que as tromboplastinas dos diferentes fabricantes fossem calibradas em relação a uma tromboplastina padrão da OMS, originando um fator de correção, o *International Sensitivity Index* (ISI) (McKenzie e Williams, 2015). Assim, o INR é o quociente entre o valor de TP do doente e o valor normal de TP (média do laboratório obtido através de valores de TP de 20-30 doentes normais), elevado ao ISI, conforme a seguinte fórmula:  $INR = \left( \frac{TP_{doente}}{TP_{valor\ normal}} \right)^{ISI}$  (Levy et al., 2014; McKenzie e Williams, 2015). Deste modo, reportar o TP como INR permitiu que houvesse padronização entre os laboratórios, permitindo definir os intervalos terapêuticos para a terapia com anticoagulantes orais.

### **Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (aPTT)**

O aPTT é um teste de coagulação usado para avaliar se há deficiências em fatores de coagulação da via intrínseca e também da via comum (Figura 10), nomeadamente dos fatores VIII, IX, XII, X, XI, protrombina e fibrinogénio, bem como averiguar a presença de inibidores da coagulação circulantes (McKenzie e Williams, 2015; Wahed et al., 2020). O aPTT também é usado para monitorização terapêutica, neste caso da heparina (Levy et al., 2014).

O reagente usado para este teste é adicionado à amostra e contém uma mistura de substitutos de fosfolípidos plaquetares (pró-coagulantes), um ativador de contacto como a sílica e cálcio para iniciar a coagulação (Levy et al., 2014; McKenzie e Williams, 2015).

Se o tempo de aPTT estiver prolongado, pode-se estar na presença de deficiências de fatores da coagulação da via intrínseca, originando doenças como a Hemofilia A e B. Com a adição de plasma normal ao plasma do doente na proporção de 1:1, é de esperar uma retoma a valores normais de aPTT (Hoffbrand e Moss, 2016; Wahed et al., 2020). Caso contrário, deve-se excluir a possibilidade de terapia anticoagulante com heparina, pois esta inibe a trombina, ou outros inibidores diretos da trombina como o medicamento Pradaxa, impedindo a formação do coágulo de fibrina. Pode-se também estar na presença de doença hepática grave ou de um inibidor, como por exemplo o anticoagulante lúpico, autoanticorpos antifosfolípidicos que prolongam reações de coagulação “*in vitro*” dependentes de fosfolípidos (Arnout, 2001).

## Tempo de Trombina (TT)

O teste de trombina (TT) (Figura 10) avalia o último passo da cascata da coagulação, nomeadamente a conversão do fibrinogénio em fibrina por ação da trombina, sendo um teste sensível para deficiência de fibrinogénio ou inibição da trombina (Hoffbrand e Moss, 2016; Mijovski, 2019). Para tal, é adicionado uma concentração padronizada de trombina à amostra do doente e é medida a formação do coágulo em segundos (Mijovski, 2019).

O TT pode então estar prolongado em casos de hipofibrinogénemia (níveis baixos de fibrinogénio), disfibrinogénemia (incorreto funcionamento do fibrinogénio) ou com a toma de heparina (Wahed *et al.*, 2020).

## 5.5. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é outra ferramenta de diagnóstico que o setor de Hematologia dispõe, embora usada com pouca frequência.

A FISH é uma técnica molecular considerada sensível e específica, usada para detetar diferentes anomalias cromossómicas com recurso a sondas fluorescentes de DNA (Nath e Johnson, 1999; Wan e Ma, 2012).

Resumidamente, o princípio da técnica baseia-se na hibridização de uma região alvo de DNA com uma sonda complementar de DNA marcada com fluoróforos. Esta hibridização ocorre após desnaturação da dupla cadeia de DNA alvo que forma uma cadeia simples de DNA, permitindo que a sonda complementar se ligue. A visualização dos complexos formados é feita usando um microscópio de fluorescência (Figura 11).

As amostras usadas para a realização da técnica incluem biópsias, aspirados de medula óssea e sangue periférico. Aplicações da técnica incluem a deteção de algumas trissomias, translocações, deleções etc. (Wan e Ma, 2012; Dey, 2018).



**Figura 11** - Foto de dois núcleos celulares provenientes de um aspirado de medula óssea de um paciente com linfoma do manto, após a técnica de FISH. O paciente apresenta a translocação  $t(11;14)$ , apresentando dois pontos verdes e vermelhos juntos (setas), sendo que o normal seria estarem separados. Os pontos verdes e vermelhos representam as sondas usadas. Fonte: Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

## 6. Setor de Microbiologia

As infecções nosocomiais são um grande problema a nível hospitalar, aumentando a mortalidade dos pacientes hospitalizados (Kalenic e Budimir, 2009), pelo que os laboratórios de Microbiologia desempenham um papel fundamental na isolamento e identificação de agentes patogénicos, bem como no diagnóstico e controlo de doenças infecciosas e devem sempre trabalhar em conjunto com o clínico para que a interpretação de resultados seja mais rápida e eficiente.

O setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG analisa diversos produtos biológicos, com o objetivo de identificar o microrganismo patogénico e determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos, de modo a que seja escolhido o fármaco mais apropriado. No IPOCFG, este setor é muito importante, pois os pacientes oncológicos encontram-se bastante imunocomprometidos, quer seja pelas suas patologias de base, quer seja pelos seus tratamentos e como tal estão muito suscetíveis a contrair infeções.

As amostras recebidas são muito variadas, desde sangue, urina, secreções respiratórias, exsudatos, punções ganglionares, fezes, pontas de cateter etc., sendo as mais comuns a urina (também para realização da sumária de urina e observação do sedimento urinário) e sangue para hemoculturas.

A receção das amostras, ao contrário dos outros setores, é feita no próprio setor de Microbiologia. As amostras têm de chegar identificadas e acompanhadas da requisição médica, que deve conter a identificação do doente e do clínico, os exames necessários, alguma informação clínica (o que nem sempre se verifica) e também qual a natureza da amostra.

Para a obtenção de resultados clinicamente relevantes, as amostras microbiológicas têm de ser devidamente colhidas, representativas do local de infeção e serem transportadas até ao laboratório o mais rapidamente possível, pois a otimização das análises e interpretação do resultado depende muito da qualidade da amostra (Miller *et al.*, 2018). Por isso, na receção é feita uma verificação da qualidade da amostra, se é transportada no recipiente e meio correto, se a quantidade de amostra é suficiente para todos os testes pedidos, se foi colhida corretamente, etc. Depois de tudo verificado, regista-se o pedido no sistema informático, obtendo-se um número de cultura para cada exame (bacteriológico, micológico ou micobacteriológico), respetivas etiquetas para os meios de cultura e uma folha de trabalho, onde será documentado tudo o que é feito e observado na amostra.

Apesar do setor de Microbiologia ser o menos automatizado, alguns equipamentos (Tabela VI) são usados no dia-a-dia de modo a agilizar o processamento de amostras e também para obter resultados rápidos e fidedignos. O setor conta também com quatro estufas com

diferentes temperaturas: 25°C, 30°C e 37°C (com e sem CO<sub>2</sub>), uma centrífuga, quatro microscópios óticos e três frigoríficos para armazenar meios de cultura, antibióticos, reagentes e amostras.

**Tabela VI** - Equipamentos e respetivas funções do setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

<b>Equipamento</b>	<b>Funcionalidade</b>
<i>Bactec 9120</i> da <b>Becton Dickinson</b>	Incubação de hemoculturas a 35°C e respetiva deteção em caso de positividade.
<i>Aerospray® TB Slidestainer</i> da <b>ELITechGroup</b> <i>Aerospray® Gram Slidestainer</i> da <b>ELITechGroup</b>	Coloração de esfregaços de amostras biológicas (coloração de Kinyoun e Gram).
<i>GeneXpert</i> da <b>Cepheid</b>	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) e <i>Micobacterium tuberculosis</i> em expetorações por técnica de PCR em tempo real.
<i>Vitek 2 Compact 15</i> da <b>Biomérieux</b>	Sistema automático para realização de testes de identificação bacteriana (ID) e testes de suscetibilidade a antibióticos (TSA).

Durante o meu estágio tive a oportunidade de observar o processamento de diversas amostras, preparar esfregaços e colocá-los no respetivo equipamento para coloração, bem como observar os esfregaços ao microscópio, repicar meios de cultura e realizar a identificação microbiana e testes de suscetibilidade a antimicrobianos. Sendo que o dia no setor de Microbiologia começa com a visualização, documentação e validação dos resultados, os meus conhecimentos foram postos à prova diariamente, permitindo que eu adquirisse novos e consolidasse outros.

Não foram observados exames parasitológicos nem pesquisa de vírus, pelo que não serão abordados no relatório.

## **6.1. Exame Direto**

Quando a amostra é recebida no laboratório, é feito o exame direto, que consiste na observação macroscópica da amostra e/ou observação microscópica a fresco e após coloração.

O estudo macroscópico de certos tipos de amostra pode ser relevante para a interpretação dos resultados, podendo dar pistas sobre uma possível infeção. A consistência, aspeto e cor das fezes, a cor, turvação, presença de sangue ou pus na urina, bem como o aspeto das secreções respiratórias, são alguns exemplos das características a ter em atenção.

O estudo microscópico da amostra, a fresco ou após coloração, permite observar ao microscópio ótico estruturas celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos etc., bem como a flora microbiana presente na amostra.

No setor de Microbiologia, o exame direto é realizado para todas as amostras, sendo o mais comum o exame microscópico a fresco e após coloração.

### 6.1.1. Colorações

#### Coloração de Gram

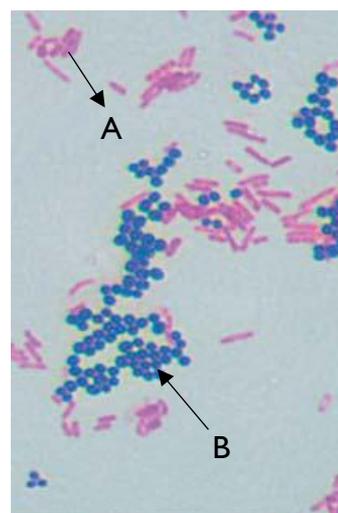
Segundo Thairu *et al.* (2014), a coloração de Gram é “um teste rápido e simples para caracterizar microrganismos”, fornecendo informações preliminares que podem ser logo transmitidas ao clínico, que ajudam a direcionar a um diagnóstico.

Esta coloração permite distinguir e dividir as bactérias em dois grupos, as bactérias Gram positivas e Gram negativas (Thairu *et al.*, 2014). O fundamento da coloração baseia-se nas diferenças da composição da parede celular bacteriana e na consequente capacidade de reter (ou não) o corante primário usado na técnica, o cristal violeta (Tortora *et al.*, 2017). As bactérias Gram positivas possuem uma parede celular com uma camada de peptidoglicano mais espessa do que as bactérias Gram negativas, pelo que retêm mais o corante primário dentro da sua parede celular quando a este é adicionado um mordente (solução de Lugol), corando-as de roxo, (Figura 12) (Thairu *et al.*, 2014). As bactérias Gram negativas possuem na parede celular uma fina camada de peptidoglicano e como tal, não conseguem reter o cristal violeta da mesma forma que as Gram positivas, sendo este extraído após a adição de etanol-acetona (diferenciador), deixando-as incolores. Para a sua visualização é usado então um corante de contraste, a fucsina, que cora as bactérias Gram negativas de rosa (Figura 12) (Yunusa *et al.*, 2014; Tortora *et al.*, 2017).

A coloração de Gram demonstra então ser um teste preliminar útil, permitindo classificar as bactérias em Gram positivas ou Gram negativas, observar a sua morfologia (bacilos, cocos, cocobacilos etc.) e o tipo de agrupamento bacteriano (em cadeia, em cacho de uva etc) (Figura 12). Permite também observar leveduras (que também coram de roxo), sendo estas maiores que as bactérias, constituindo uma informação adicional que se obtém com o Gram.

#### Coloração de Kinyoun

Outra coloração muito usada no setor de Microbiologia é a coloração de Kinyoun para deteção de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) como as bactérias do género *Mycobacterium*, sendo muito usada em esfregaços de amostras de secreções respiratórias.



**Figura 12** - Foto de bactérias coradas pela coloração de Gram. A – Bacilos Gram negativos (rosa); B – Cocos Gram positivos (roxo). Adaptado de Tortora *et al.*, 2017.

Esta coloração baseia-se no facto das micobactérias apresentarem uma parede celular diferente das bactérias Gram positivas e negativas, com uma grande quantidade de ácidos micólicos. Isto permite que retenham o corante primário carbolfucsina após uma descoloração com um álcool-ácido (Murray, 2015; Tortora *et al.*, 2017; Mishra e Mishra, 2019), deixando todas as outras células incolores e os BAAR de vermelho. Tal como na coloração de Gram, é necessário aplicar um corante de contraste, neste caso o azul de metileno, que cora todas as outras células e flora microbiana de azul.

Esta coloração é também um teste rápido que pode ser feito em qualquer amostra com pedido para exame micobacteriológico, sendo que a visualização de um BAAR numa lâmina é altamente sugestiva de infeção (Fitzgerald *et al.*, 2015).

## **6.2. Exame cultural e meios de cultura**

O diagnóstico laboratorial assenta maioritariamente no facto de conseguirmos retirar o organismo patogénico do local da infeção (*in vivo*) e depois isolá-lo e crescê-lo *in vitro*, permitindo a sua identificação e caracterização. Assim, o exame cultural (bacteriológico, micobacteriológico ou micológico) é muito importante para atingir este objetivo. As amostras recebidas são semeadas em meios de cultura apropriados e colocadas em condições de incubação adequadas para garantir o crescimento microbiano.

Os meios de cultura podem ser sólidos, permitindo a obtenção de colónias visíveis a olho nu, ou líquidos cujo aparecimento de turvação indica crescimento microbiano. Os meios de cultura podem dividir-se essencialmente em quatro tipos, conforme a sua composição: não seletivos, seletivos, diferenciais e de enriquecimento.

De um modo geral, os meios não seletivos suportam o crescimento de diversos microrganismos, não contendo componentes que inibam outros, podendo também ter aditivos (como sangue) que permitam o crescimento de microrganismos fastidiosos (Murray, 2015). Já os meios seletivos permitem apenas que certos microrganismos se desenvolvam e inibem o crescimento de outros através do uso de sais biliares, corantes, antibióticos etc. (Kayser *et al.*, 2005; Zimbro *et al.*, 2009; Murray, 2015). Os meios de enriquecimento são normalmente meios líquidos, semelhantes aos meios seletivos, mas estes contêm nutrientes específicos de modo a favorecerem o crescimento de um certo microrganismo e inibirem outros, permitindo a sua repicagem para meios sólidos com eventual obtenção de colónias puras (Forbes *et al.*, 2007; Tortora *et al.*, 2017). Por último, os meios diferenciais contêm diferentes substratos, que com base em características bioquímicas/metabólicas do microrganismo permitem uma identificação presuntiva, diferenciando-os de outros

microrganismos que possam estar presentes na amostra (Forbes *et al.*, 2007; Zimbro *et al.*, 2009; Murray, 2015).

Devido à sua importância, muitos dos meios de cultura comercializados apresentam mais do que uma característica, podendo um meio ser diferencial e seletivo ao mesmo tempo (Forbes *et al.*, 2007).

A Tabela VII apresenta alguns dos meios de cultura utilizados no setor de Microbiologia, com as respectivas descrições.

**Tabela VII** - Alguns dos meios de cultura utilizados para o exame cultural no setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

Meio	Tipo	Descrição
CLED	Diferencial	Meio deficiente em eletrólitos usado no isolamento e identificação presuntiva de microrganismos presentes na urina. Inibe o <i>swarming</i> do <i>Proteus sp.</i> e diferencia bactérias fermentadoras da lactose (colônias amarelas) de não fermentadoras (colônias azuis), através de um indicador de pH.
CNA	Seletivo	Isolamento e diferenciação de bactérias Gram positivas (usado nas amostras urinárias). Contém colistina e ácido nalidíxico que inibe certas bactérias Gram negativas.
COS	Não seletivo	Meio nutritivo para crescimento de vários microrganismos, fastidiosos e não fastidiosos. Permite detetar reações de hemólise e o tipo.
PVX	Não seletivo Enriquecimento	Meio muito nutritivo que permite o crescimento/recuperação e isolamento de vários microrganismos, sobretudo fastidiosos, como <i>Haemophilus spp.</i> e <i>Neisseria spp.</i>
Hektoen	Seletivo Diferencial	Isolamento e diferenciação de bactérias entéricas, especialmente <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> em amostras de fezes. A sua composição inclui sais biliares que inibem bactérias Gram positivas. Permite a formação e colônias com precipitados negros ( <i>Salmonella spp.</i> ).
Caldo Selenito	Enriquecimento	Meio líquido para recuperação de <i>Salmonella spp.</i> em amostras de fezes, através da ação inibitória (temporária) do selenito de sódio, que inibe muitas bactérias Gram positivas e negativas pertencentes à flora intestinal e que possam inibir o crescimento da <i>Salmonella spp.</i>
Caldo Coração – Cérebro (BHI)	Não seletivo	Meio líquido muito nutritivo usado para o crescimento de muitos microrganismos, incluindo aeróbios, anaeróbios e fastidiosos, permitindo a recuperação dos mesmos e de outros que se possam encontrar em baixa quantidade na amostra.
Meio/Caldo Schaedler	Não seletivo	Meios nutritivos para isolamento e crescimento de microrganismos anaeróbios.
Loweinstein-Jensen (LJ)	Seletivo Enriquecimento	Meio de cultura para micobactérias, que suporta o crescimento/metabolismo através da adição de ovo cozido e glicerol. Contém verde de malaquita, um corante que inibe contaminantes e/ou outros microrganismos que tenham sobrevivido durante a homogeneização/descontaminação da amostra (maioritariamente secreções respiratórias).

Sabouraud cloranfenicol gentamicina (SGC)	Seletivo	Meio de cultura para fungos filamentosos e leveduras. O pH ácido do meio e a adição dos dois antibióticos inibe uma grande variedade de bactérias Gram positivas e negativas, favorecendo o crescimento fúngico.
----------------------------------------------------	----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**CLED:** Cistina – lactose deficiente em eletrólitos; **CNA:** gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro, colistina e ácido nalidíxico; **COS:** gelose Columbia suplementada com 5% de sangue de carneiro; **PVX:** gelose de chocolate PolyViteX. Fonte: Fonseca *et al.*, 2004; Forbes *et al.*, 2007; Zimbro *et al.*, 2009.

A observação do exame cultural, feito pela manhã no setor de Microbiologia, normalmente após 24 horas de incubação, permite analisar as características macroscópicas das colónias, que podem ser fundamentais para uma identificação presuntiva. O tamanho, forma e consistência das colónias, a presença de hemólise, a cor das colónias (que depende do meio utilizado) ou até mesmo o cheiro, são alguns dos parâmetros mais relevantes (Levy *et al.*, 2004). Estas informações, juntamente com o tipo de amostra, local de onde foi colhida e o contexto clínico (se disponível), permitem decidir o que terá significado clínico (se é patogénico ou comensal/contaminação) e a consequente repicagem de colónias de interesse para outros meios seletivos e/ou diferenciais. Esta repicagem permitirá obter colónias puras e prosseguir para a identificação e determinação de susceptibilidades a antibióticos.

### 6.3. Processamento laboratorial das amostras biológicas

O processamento das amostras que chegam ao setor depende do tipo e origem do produto biológico e claro, dos exames pedidos pelo clínico.

De um modo geral é realizado para cada amostra:

- Coloração de Gram e/ou a coloração de Kinyoun (quando solicitado para pesquisa de BAAR);
- Inoculação das amostras biológicas em meios de cultura e incubação durante 24 horas, máximo 48 horas;
- Observação do crescimento microbiano e repicagem das colónias de interesse ou dos meios líquidos para outros meios de cultura sólidos. Caso não haja crescimento microbiano após 48 horas e não for observado flora microbiana no exame direto, o resultado é dado como negativo;
- Testes de identificação (ID) do agente patogénico e respetivo teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA).

### 6.3.1. Urinas

As infeções do trato urinário (ITU) são das infeções mais frequentes na comunidade e também uma das mais frequentes em contexto hospitalar (Levy et al., 2004; Forbes et al., 2007). As infeções hospitalares são devido ao uso de cateteres urinários nos pacientes hospitalizados, através da colonização do cateter por microrganismos (Saint et al., 2007).

As ITU são geralmente causadas por uma invasão de microrganismos da flora intestinal, da região anal para o trato urinário, via uretra, sendo *Escherichia coli* (Enterobactéria) o patógeno mais comum (Pezzlo, 2014). Outros agentes etiológicos incluem a *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Levy et al., 2004; Forbes et al., 2007; Pezzlo, 2014; Murray, 2015).

As amostras de urina são entregues num copo de urina esterilizado e correspondem, na maioria dos casos, ao jato intermédio, sendo que a colheita pode também ser realizada através de punção supra-púbica, de um cateter urinário ou drenagem de nefrostomia/ureterostomia.

#### Uroculturas

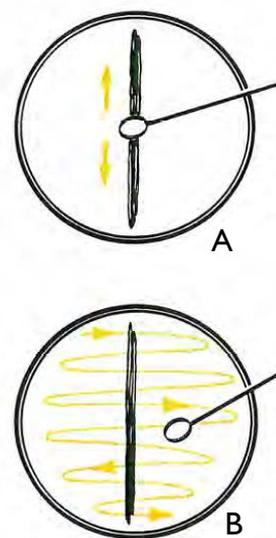
A urocultura efetua-se em primeiro lugar para evitar a contaminação da amostra e permite uma análise quantitativa e identificativa dos microrganismos que possam ser responsáveis pela ITU.

A urina deve ser primeiro homogeneizada e só depois se procede à inoculação por esgotamento de um só plano, com recurso a uma ansa de plástico esterilizada e calibrada (1 µl) (Figura 13) dos meios CNA, CLED e SGC (caso seja pedido exame micológico). Após a incubação a 37°C durante 24 a 48 horas procede-se à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC).

#### Sumária da urina

A próxima etapa a realizar é a sumária da urina, um teste de *screening* rápido e útil que pode ajudar a detetar a presença de uma ITU (Young e Soper, 2001).

Normalmente é requisitado juntamente com a urocultura e consiste na avaliação macroscópica da urina (cor, turvação), na análise de alguns parâmetros bioquímicos e físicos, com recurso a uma tira-teste *Combur<sup>10</sup> Test M* e na observação microscópica do sedimento urinário (objetiva de 40x). Alguns dos parâmetros



**Figura 13** - Representação esquemática do esgotamento quantitativo usado nas uroculturas. É realizado um traço longitudinal (A) e de seguida, com a mesma ansa, preenche-se perpendicularmente todo o meio com estrias apertadas (B). Adaptado de Forbes et al., 2007.

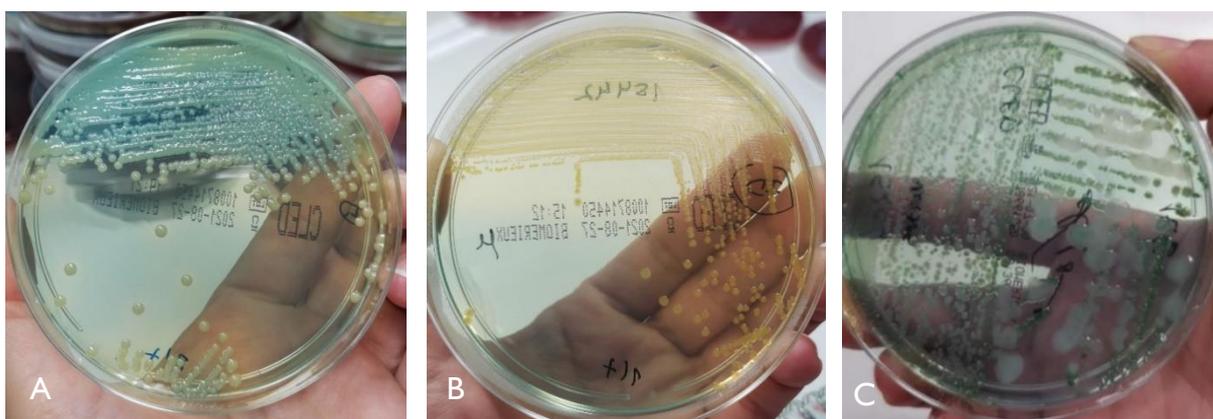
analisados pelas tiras-teste incluem o pH, a densidade da urina, presença de nitritos, glicose, proteínas, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio, leucócitos e sangue.

### **Interpretação de resultados**

A interpretação e valorização dos resultados das uroculturas deve ter em conta o modo de colheita (jato intermédio, punção supra-púbica etc.), bem como a história clínica do doente (sexo, sintomas, idade ou se iniciou antibioterapia) (Forbes *et al.*, 2007).

No caso da urina obtida por jato intermédio, a urocultura é, por norma, considerada positiva quando há um crescimento de  $10^5$  UFC ou mais por mililitro (mL), equivalente a uma contagem igual ou superior a 100 colónias num microlitro. No entanto, se a amostra de urina provém de uma punção supra-púbica (por exemplo), um crescimento microbiano inferior a  $10^5$ /mL é valorizável, devendo ser descartada a hipótese de contaminação com flora comensal da pele pelas características das colónias.

Se a urocultura é positiva, é feita uma repicagem da colónia ou das colónias predominantes (até duas colónias) para um outro meio CLED (Figura 14) de modo a obter colónias puras e isoladas para efetuar o ID e TSA.



**Figura 14** - Imagens de uroculturas positivas em meio CLED, após repicagem. A - Colónias mucosas características de *Klebsiella pneumoniae*; B - Colónias amarelas de *Escherichia coli*; C - Amostra com duas colónias diferentes (mucosas e verdes).

Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

O crescimento fúngico é valorizável quando predominante ou na ausência de crescimento bacteriano, sobretudo se o paciente apresentar histórico de infeção urinária por fungos.

Os resultados da sumária de urina são também úteis para ajudar na interpretação dos resultados da urocultura. Nas tiras-teste, alguns parâmetros relevantes, para os quais é chamada a atenção, são o pH, os leucócitos e nitritos. Segundo Young e Soper (2001) e Simerville *et al.* (2005), a presença de nitritos na urina deve-se à presença de bactérias que reduzem os nitratos em nitritos, consequentemente aumentando o pH da urina (que por norma é ácida). A presença de leucócitos, tanto na tira-teste, como no sedimento urinário, é

sugestiva de uma resposta imunitária à infecção (Forbes *et al.*, 2007) e tem um valor preditivo positivo para a presença de uma ITU, juntamente com os nitritos e pH básico. Numa ITU a presença de sangue na urina (hematúria) é também sugestiva de ITU, quando juntamente com outros parâmetros.

### **6.3.2. Sangue**

Denomina-se bacteriemia e fungemia à presença de bactérias e fungos, respectivamente, na corrente sanguínea (Murray *et al.*, 2016). A invasão de microrganismos na corrente sanguínea é um dos problemas mais sérios no que toca as doenças infecciosas, representando uma ameaça a qualquer órgão devido à possibilidade de sépsis, falha multiorgânica ou até morte (Magadia e Weinstein, 2001; Pal *et al.*, 2009). Deste modo, é muito importante a rápida deteção de infeções sanguíneas e identificação do patógeno em questão, constituindo uma das funções mais importantes do setor de Microbiologia.

Para uma deteção bem-sucedida dos possíveis agentes patogénicos, há que ter em atenção alguns aspetos durante a colheita do sangue, feita diretamente para um frasco de hemocultura. O volume de sangue necessário depende do fabricante do frasco e deve ser respeitado, pois assim há maior probabilidade de isolar o agente etiológico da infeção (Levy *et al.*, 2004). Uma assepsia eficaz da pele, aquando da punção venosa de veias periféricas também é muito importante para evitar a contaminação da amostra com flora comensal da pele, sendo o mesmo válido para a colheita de sangue através de punção de um cateter venoso central. Também para auxiliar a distinção entre uma infeção e uma contaminação, durante a interpretação dos resultados, é sempre recomendado retirar uma amostra de duas veias periféricas diferentes e, do cateter venoso central, quando presente (Magadia e Weinstein, 2001; Forbes *et al.*, 2007; Murray, 2015; Giuliano *et al.*, 2019). Este procedimento é sempre feito no IPOCFG, sendo colhidas amostras de sangue para 2 ou 3 frascos de hemoculturas por doente.

Conforme requisição médica, o sangue é colhido para os frascos apropriados, sendo o mais comum as hemoculturas para aeróbios. Estes frascos permitem o crescimento de grande parte das bactérias, bem como o de fungos leveduriformes, contendo um meio enriquecido de tripticase de soja, um anticoagulante e esferas de resina quelantes de antimicrobianos, importante no caso de pacientes que já iniciaram a antibioterapia aquando da colheita (Levy *et al.*, 2004), o que é muito frequente nos doentes oncológicos. Há também frascos de hemocultura para pesquisa de anaeróbios, com um meio de tripticase de soja reduzido com CO<sub>2</sub> e agentes lisantes, que permitem o crescimento e recuperação de microrganismos intracelulares, fastidiosos e anaeróbios.

## Processamento e interpretação de resultados

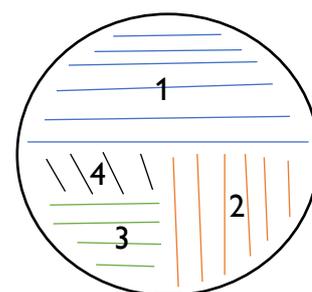
Quando os frascos de hemocultura são recebidos no setor, estes são colocados no sistema **BACTEC 9120**, que mantém as amostras em constante agitação e incubação a 35°C.

A detecção de crescimento microbiano pelo equipamento baseia-se na quantidade de CO<sub>2</sub> que é produzido durante o crescimento dos microrganismos, resultante do metabolismo celular. Este CO<sub>2</sub> é detetado pelo equipamento através de um sensor químico, permeável ao gás e localizado no fundo de cada frasco, que emite fluorescência. O sensor é monitorizado a cada 10 minutos para o aumento da emissão de fluorescência, que é proporcional à quantidade de CO<sub>2</sub> produzida, emitindo um sinal sonoro e visual quando uma amostra é positiva, indicando a presença de um possível microrganismo (Magadia e Weinstein, 2001; Pat et al., 2009; Shetty et al., 2011).

As amostras bacteriológicas (aeróbias e anaeróbias) incubam durante 7 dias, sendo o tempo alargado para os 14 dias para a pesquisa de fungos.

### **Hemoculturas positivas**

As amostras são processadas o mais rapidamente possível quando a hemocultura dá positiva. É retirado uma pequena quantidade de sangue, usando uma seringa, para repicar nos seguintes meios de cultura: COS para aeróbios e COS + meio Schaedler sólido para anaeróbios. Os meios são então estriados com uma ansa de plástico estéril pela técnica de esgotamento do produto à superfície (Figura 15) e incubados durante 24 a 48 horas (aeróbios) e 5 dias (anaeróbios) a 37°C. Sendo o meio Schaedler seletivo para anaeróbios, é colocado no sistema GENbag, que consiste numa pequena bolsa de plástico hermética com um gerador de atmosfera anaeróbia e um indicador de controlo da mesma. Com a mesma seringa, são feitos dois esfregaços de cada hemocultura do doente, com uma gota em cada lâmina, sendo que um deles é rapidamente corado pela coloração de Gram e observado microscopicamente. O duplicado serve de confirmação, caso haja dúvidas e para prevenir, caso algo aconteça. A coloração de Gram permitirá observar a morfologia microbiana, bem como outros aspetos clinicamente relevantes, sendo esta informação dada rapidamente ao médico.



**Figura 15** - Representação esquemática do esgotamento do produto à superfície (4 planos).

Se no esfregaço corado se observarem microrganismos, mas não se verificar crescimento no meio COS após o período de incubação, faz-se uma repicagem das hemoculturas para o meio PVX, pois pode tratar-se de um microrganismo fastidioso como *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.* ou *Streptococcus pneumoniae*.

A observação do esfregaço corado também permite despistar falsos positivos, em que não se observam microrganismos no esfregaço. Esta situação pode acontecer se o doente apresentar uma leucocitose, o que faz também aumentar a produção de CO<sub>2</sub> devido ao metabolismo das células e, conseqüentemente aumentar na fluorescência.

Se apenas uma das duas ou três hemoculturas do paciente for positiva, podemos estar perante uma contaminação com microbiota da pele, como por exemplo com *Staphylococcus epidermidis* (Murray, 2015), devendo na mesma proceder-se à observação dos esfregaços e inoculação do meio de cultura. Por outro lado, o crescimento do mesmo organismo em várias hemoculturas do doente indica que é o responsável pela infeção podendo até pertencer à microbiota comensal da pele, algo que pode acontecer em pacientes imunocomprometidos (Forbes *et al.*, 2007).

### **Hemoculturas negativas**

As hemoculturas que após o período estipulado (7 ou 14 dias) não positivarem, são consideradas negativas, devendo ser confirmado com um esfregaço e coloração de Gram a ausência de microrganismos.

### **6.3.3. Amostras do trato respiratório inferior**

Segundo Rolston (2001) as infeções pulmonares são muito frequentes em pacientes oncológicos, sendo estes mais suscetíveis devido à desregulação imunitária causada pelas neoplasias, podendo desenvolver complicações mais sérias como bacteriemia ou sépsis (Ruckdeschel *et al.*, 2003). Em pacientes neutropénicos e/ou com (outros) défices imunitários, predominam infeções por bactérias Gram negativas, infeções por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus*, sendo também comum as infeções fúngicas e por micobactérias (Rolston, 2001; Forbes *et al.*, 2007). Em todos estes casos, a pneumonia é a manifestação clínica mais comum.

Durante o meu estágio, apenas foram recebidas amostras do trato respiratório inferior, sendo as amostras mais frequentes as expetorações, os lavados e aspirados brônquicos e com muito menos frequência os líquidos pleurais e lavados broncoalveolares.

Apesar de ser uma amostra muito frequente, a expetoração pode facilmente ser contaminada com microbiota das vias respiratórias superiores e com saliva, podendo comprometer a interpretação dos resultados (Forbes *et al.*, 2007; Murray, 2015; Miller *et al.*, 2018). Por isso, a expetoração deve ser obtida por uma tosse profunda e de preferência a primeira da manhã (mais concentrada) para um contentor estéril, devendo ser rejeitadas as amostras com saliva.

Neste tipo de amostra, é feito primeiramente um exame direto, em que é feito um esfregaço de uma porção mais purulenta numa lâmina e efetuada a coloração de Gram. Deste modo, o laboratório pode aferir a qualidade da amostra para exame cultural, distinguindo se se trata de uma verdadeira expetoração ou de uma saliva. Para tal, é feita uma contagem, com a objetiva de 10x, do número de leucócitos e células epiteliais por campo, que será interpretada de acordo com os critérios de Murray & Washington (Tabela VIII). Uma amostra aceitável e clinicamente relevante será aquela que apresenta menos de 10 células epiteliais por campo (grupo 5), aceitando-se também amostras que se insiram no grupo 4. Por vezes, em doentes neutropénicos, podem não ser observados leucócitos (Forbes *et al.*, 2007), sendo uma exceção que deve ser tida em conta, uma vez que as amostras provêm de doentes oncológicos.

**Tabela VIII** - Critérios de Murray & Washington usados para avaliar a qualidade de uma expetoração.

Grupos	Nº de células epiteliais	Nº de leucócitos
1	≥ 25	≤ 10
2	≥ 25	10 – 25
3	≥ 25	≥ 25
4	10 – 25	≥ 25
5	< 10	≥ 25

Consoante as análises pedidas, é também efetuado esfregaços das amostras para pesquisa de BAAR, usando a coloração de Kinyoun (exame direto).

Por fim, após a realização dos exames diretos, as amostras são processadas para o exame cultural consoante os exames pedidos pelo clínico.

## **Processamento e interpretação de resultados**

### **Exame bacteriológico**

As amostras são semeadas em meio COS e PVX (Tabela VI) pela mesma técnica usada nas repicagens das hemoculturas positivas e incubadas em estufa com atmosfera CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C durante 24 horas. As placas são depois analisadas, devendo-se ter em conta a microbiota local, pois esta também poderá crescer e o conhecimento das características das colónias é fundamental na interpretação dos resultados.

Caso se verifique o crescimento de uma colónia com características diferentes da microbiota comensal, esta é repicada para outro meio COS ou PVX (conforme a suspeita) para isolamento. Também é realizada a repicagem no caso de predomínio de um tipo de colónia em um ou em ambos os meios. Em ambos os casos, deve-se ter em atenção o observado no Gram.

No meio COS pode-se observar a hemólise, permitindo detetar *Staphylococcus aureus* (hemólise completa, denominada  $\beta$ -hemólise), enquanto que o meio PVX permite detetar organismos fastidiosos como o *Haemophilus spp.*, que apresentam colónias redondas, opacas, beges a cinzentas, sem hemólise (Figura 16).

Por fim, é realizado a identificação e TSA.

### Exame micológico

O exame micológico é normalmente requisitado para as amostras do trato respiratório, sendo estas semeadas em duas geloses SGC. Uma das geloses é incubada a 37°C durante 24 horas para pesquisa de leveduras, cujo crescimento é valorizável na ausência de crescimento bacteriano ou se há predominância nos meios. A outra gelose é incubada a 30°C para fungos filamentosos durante 1 mês e avaliada ao longo dos dias, pois o seu crescimento é muito mais demorado que as leveduras.

Pacientes com doenças hematológicas, que se apresentem leucopénicos e a receber antibioterapia prolongada, são os que têm mais probabilidades de desenvolver uma infeção fúngica oportunista, sendo as mais comuns as infeções causadas por *Aspergillus spp.* (Figura 17) (Rolston, 2001). Como tal, o crescimento de fungos filamentosos é de valorizar nas amostras de pacientes oncológicos, devendo-se investigar para ver se é uma contaminação ou não.

No caso de crescimento de fungos filamentosos, primeiro observam-se as colónias, para uma identificação presuntiva, nomeadamente a cor, o aspeto e a textura da colónia e o tipo de micélio. Estas características devem complementar as observadas microscopicamente, cuja identificação definitiva é baseada na forma e tamanho das hifas, se são septadas/asseptadas, no método de reprodução e forma das estruturas reprodutoras (Forbes et al., 2007).

O método usado para a observação microscópica é o método da fita-cola, fazendo tocar um pedaço de fita-cola na colónia. Entre lâmina e lamela, o pedaço de fita-cola é colocado em cima de uma gota do corante azul de lactofenol, que preserva e cora as estruturas fúngicas



**Figura 16** - Colónias de *Haemophilus spp.* em meio PVX.

Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.



**Figura 17** - Observação microscópica de *Aspergillus spp.* numa amostra respiratória (40x).

Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

de azul. É também feita a repicagem do fungo, por picada, em que é retirado um pedaço da periferia da colónia (parte mais jovem) e colocada no centro numa nova gelose SGC, de modo a permitir o crescimento do fungo e, se necessário, fazer mais testes e observações.

### Exame micobacteriológico

Quando se suspeita de uma infeção respiratória por micobactérias, é comum pensar em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose. Apesar desta doença poder envolver outros órgãos, a maioria das infeções por este microrganismo em pacientes imunocomprometidos restringe-se aos pulmões (Murray *et al.*, 2016).

Após a realização de esfregaços para exame direto, as amostras respiratórias prosseguem para a homogeneização/descontaminação, cujo objetivo é eliminar microrganismos contaminantes (como a microbiota comensal respiratória), diminuir a viscosidade da amostra e concentrá-la através de centrifugação (Villela e Ferrazoli, 2013).

Da amostra homogeneizada, é feito dois novos esfregaços para coloração de Kinyoun, que facilitará a pesquisa de BAAR, caso estes se encontrem em pequeno número na amostra. A interpretação dos esfregaços diretos e após homogeneização é feita de acordo com a Tabela IX.

De seguida, a amostra é semeada em meio COS e em meio LJ e também é inoculado em um Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT). O meio COS serve para controlo da eficácia da homogeneização, pois se houver crescimento de colónias, o processo tem de ser repetido. Os meios LJ e MGIT são incubados a 37°C, em aerobiose, durante oito semanas.

**Tabela IX** - Interpretação de esfregaços para pesquisa de BAAR pela coloração de Kinyoun.  
Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

Número de BAAR observados	Interpretação
0	Negativo
1-2/300 campos	Duvidoso (confirmar)
1-9/100 campos	Positivo
1-9/10 campos	
1-9/campo	
>9/campo	

O MGIT deteta o crescimento de micobactérias através de um composto fluorescente que é sensível ao oxigénio presente no tubo (Varma-Basil e Bose, 2019). Estes tubos são monitorizados semanalmente num equipamento próprio que lê fluorescência, que, conforme o valor de *cut-off*, indica se a amostra é positiva ou negativa. O tubo com meio LJ é também monitorizado em simultâneo, para verificar se há ou não desenvolvimento de colónias, que no caso de *Mycobacterium tuberculosis* apresentam cor creme/amarelada, com textura rugosa, lembrando o aspeto de “couve-flor”, como apresentado na Figura 18 (Kayser *et al.*, 2005; Villela e Ferrazoli, 2013).

Caso haja crescimento no meio LJ, é feito um esfregaço das colónias com a coloração de Kinyoun para observação dos BAAR. Se forem observados, é feito um PCR em tempo real para identificar se se trata de *M. tuberculosis* e caso se confirme, é enviado para o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) para estudo da suscetibilidade a antimicrobianos.



**Figura 18** - Colónias características de *Mycobacterium tuberculosis* em meio Lowenstein-Jensen. Adaptado de Kayser et al., 2005

### 6.3.4. Exsudatos purulentos

Os exsudatos purulentos são o resultado de um processo infeccioso frequentemente observado, podendo ter origem em infeções superficiais ou mais profundas, à medida que os microrganismos invadem tecidos, cavidades ou até órgãos (Vandepitte et al., 2003). Alguns dos agentes etiológicos mais comuns são bactérias, nomeadamente *Staphylococcus aureus*), enterobactérias como *Escherichia coli* ou *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus  $\beta$ -hemolíticos* etc. (Vandepitte et al., 2003; Forbes et al., 2007; Kumari et al., 2018).

Drenagens e pus de feridas cirúrgicas, abscessos (superficiais ou profundos) e de feridas abertas são alguns exemplos dos produtos biológicos recebidos no setor de Microbiologia. Por rotina, os exames requisitados são o bacteriológico e o micológico e o processamento depende de como são colhidas as amostras: zaragatoas do exsudato (em meio de transporte apropriado), seringas (aspiração de abscessos) ou contentores com amostra. Caso a amostra seja proveniente de uma lesão fechada, o clínico pode também requerer a pesquisa de anaeróbios. Neste caso, a amostra é colhida com uma seringa, que deve vir bem selada de modo a impedir a entrada de oxigénio.

### Processamento e interpretação de resultados

#### **Exame bacteriológico e micológico**

As amostras são semeadas em meio COS, PVX e SGC e incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas. Paralelamente são também efetuados esfregaços das amostras para corar pela técnica de Gram (exame direto). Para além da observação da morfologia microbiana, é também possível observar leucócitos polimorfonucleares, associados à resposta inflamatória da infeção bacteriana.

No caso de pesquisa de anaeróbios a amostra é também semeada em meio sólido Schaedler, colocada em atmosfera de anaerobiose (*GENbag*) e incubada a 37°C durante 5 dias.

Se houver pouca quantidade de amostra, esta pode ser inoculada em tubos com caldo Coração-Cérebro (BHI) e/ou caldo Schaedler com vitamina K<sub>3</sub> (KCS), ambos meios enriquecidos para facilitar o crescimento e recuperação de microrganismos. Os meios BHI e KCS são também incubados a 37°C. A tampa do KCS (caldo apropriado para bactérias anaeróbias fastidiosas) deve ser muito bem fechada para impedir a entrada de oxigênio. Se estes meios turvarem, indicativo de crescimento microbiano, são repicados para dois meios COS e para um meio Schaedler sólido (só a partir do caldo KCS), bem como também são feitos esfregaços de ambos os meios líquidos para coloração de Gram. A repicagem do meio KCS para meio COS (em atmosfera de aerobiose) é uma forma de controlar se os microrganismos que cresceram são mesmo anaeróbios.

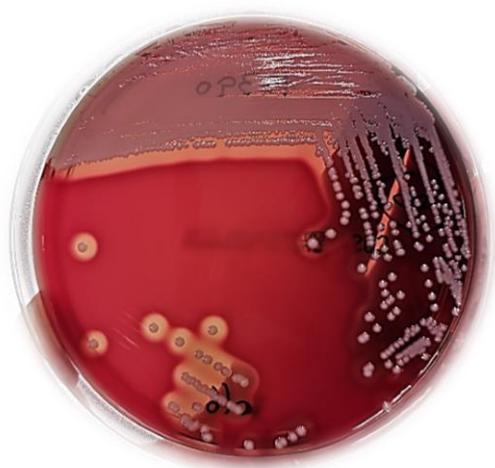
A interpretação dos resultados, após a observação das colônias nos meios de cultura, dependerá da localização da ferida/abcesso e do conhecimento da microbiota que pode estar associada (Vindepitte *et al.*, 2003).

Por exemplo, abscessos peritoneais (região abdominal) podem conter enterobactérias e/ou bactérias da microbiota intestinal; em exsudatos purulentos aspirados da cavidade pleural (pulmões) pode-se encontrar pneumococos, estreptococos ou até *Haemophilus influenzae*; as infecções nosocomiais pós-cirúrgicas têm como agente etiológico mais frequente a bactéria *Staphylococcus aureus* (por vezes MRSA resistente) (Figura 19), seguido de *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Candida spp.* etc. (Vindepitte *et al.*, 2003; Forbes *et al.*, 2007).

Caso não se verifique crescimento microbiano ou se a amostra for polimicrobiana, com características da microbiota do local de origem, sem predomínio evidente, a amostra é considerada negativa. As colônias relevantes/suspeitas seguem para ID e TSA.

#### **6.4. Identificação microbiana (ID) e Testes de suscetibilidade a antibióticos (TSA)**

Após a valorização clínica dos resultados e repicagem das colônias suspeitas/relevantes, procede-se à identificação dos patógenos e à determinação da suscetibilidade aos antibióticos, etapas muito importantes no combater da infecção, direcionando o clínico a aplicar uma antibioterapia mais adequada e eficaz.



**Figura 19** - Colônias de *Staphylococcus aureus* em meios COS, com beta-hemólise. As colônias apresentam-se redondas, brancas e opacas.

Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

No setor de Microbiologia, o ID e o TSA realizam-se no *Vitek 2 Compact 15* (Tabela V) a partir de colónias isoladas e puras. Também é possível fazer testes manuais de identificação (apenas presuntiva, com recurso a provas bioquímicas) e também TSA manuais.

#### **6.4.1. Identificação presuntiva por provas bioquímicas – Teste da oxidase**

Certas provas bioquímicas podem ser usadas para uma identificação preliminar presuntiva, com base em diferentes características bioquímicas, exibidas por diferentes bactérias.

Durante o meu estágio, tive oportunidade de realizar o teste da oxidase, que deteta a presença da enzima citocromo oxidase. Esta atua no fim da cadeia transportadora de eletrões, transportando-os para o oxigénio (recetor final de eletrões), formando água. É um teste útil para distinguir *Pseudomonas sp.* (oxidase positiva) de Enterobactérias (oxidase negativa) (Shoaib et al., 2020). Para detetar esta enzima, recorre-se a tiras comerciais que contêm o reagente dicloridrato de tetrametil-p-fenilenediamina, que adquire uma cor azul-roxo quando oxidado (Shoaib et al., 2020). O aparecimento de cor indica a presença desta enzima, enquanto que um resultado incolor indica a sua ausência.

#### **6.4.2. Biologia molecular**

O desenvolvimento de testes moleculares ao longo dos anos, baseados na deteção de ácidos nucleicos por técnica de PCR, têm permitido aos laboratórios detetar, com uma maior rapidez e sensibilidade, diversos microrganismos patogénicos em vários produtos biológicos, sendo especialmente útil para microrganismos com crescimento cultural lento. Estas técnicas também permitem detetar resistências a antibióticos, podendo ajudar o clínico a mudar ou adequar a antibioterapia e também para controlo epidemiológico.

Tendo o objetivo de proporcionar uma resposta rápida para o tratamento de certas infeções, o setor de Microbiologia realiza alguns testes moleculares pela técnica de PCR em tempo real no equipamento *GeneXpert* (*Cepheid*).

Nas amostras de expetoração é usado o kit comercial *Xpert MTB/RIF* para a deteção de *Mycobacterium tuberculosis* (agente etiológico da tuberculose) e de mutações relacionadas com a resistência à rifampicina, nomeadamente no gene *rpoB*, que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase bacteriana (Lourenzo e Mousa, 2011; de Lima et al., 2017). A rifampicina é considerada o antibiótico de primeira linha para o tratamento da tuberculose, que inibe a RNA polimerase ao ligar-se à subunidade  $\beta$ , consequentemente inibindo a síntese de RNA (Lourenzo e Mousa, 2011). Um teste de PCR positivo para *M. tuberculosis* tem também de ser

confirmado com a visualização de BAAR num esfregaço da amostra com a coloração de Kinyoun.

Em amostras de sangue, com hemoculturas positivas e com visualização no esfregaço de cocos Gram positivos sugestivos de *Staphylococcus aureus* ou quando há suspeita desse microrganismo, o setor utiliza o kit Xpert MRSA/SA BC, que permite identificar *S.aureus* e *S.aureus* resistente à meticilina (MRSA), sendo este último uma das mais importantes causas de infeções nosocomiais no mundo (Wielders *et al.*, 2002). O teste permite detetar o gene *mecA*, responsável pela resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Cristino, 2000; Humphreys, 2012). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ligam-se a proteínas de ligação à penicilina (PBP), inibindo a síntese da parede celular (Ali *et al.*, 2021). O gene *mecA* codifica uma PBP alterada, a PBP2a, resultando numa menor afinidade de ligação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos a esta proteína (Cristino, 2000; Ali *et al.*, 2021). A resistência advém então do facto de haver uma alteração na proteína da parede celular, a PBP, à qual o antibiótico se ligava, resultando na sua ineficácia.

### 6.4.3. Vitek 2 Compact 15: Identificação definitiva e TSA

No setor de Microbiologia do IPOCFG, a identificação definitiva do microrganismo e respetivo TSA é realizada pelo sistema automático Vitek 2 Compact 15 (Biomérieux). Este sistema possui cartas de identificação e de TSA automáticas, específicas para um dado grupo de microrganismos.

Após a escolha da carta, faz-se uma suspensão a partir de colónias puras do microrganismo a identificar em 3mL de solução salina. Dependendo da carta, a suspensão microbiana tem que ter uma determinada densidade da escala McFarland (Tabela X).

Para garantir que a identificação e TSA foram feitos a partir de colónias puras, é sempre realizado um “controlo ID”, que consiste em inocular uma gota da suspensão num meio sólido, permitindo também preservar o microrganismo caso seja necessário realizar mais testes.

**Tabela X** - Tipos de cartas de identificação utilizadas pelo sistema Vitek 2 Compact 15 e respetivos microrganismos que identificam, bem como as densidades necessárias para a suspensão.

Carta de identificação	Microrganismos	Densidade McFarland
GN	Gram negativos	0,6-0,63
GP	Gram positivos	0,6-0,63
YST	Leveduras	1,8-2,20
NH	<i>Haemophilus spp.</i> e <i>Neisseria spp.</i>	2,70-3,30
ANC	Anaeróbios e <i>Corynebacterium spp.</i>	2,70-3,30

As cartas de identificação são constituídas por 64 poços, que contêm diferentes substratos bioquímicos para avaliar diferentes atividades metabólicas do microrganismo em questão, que depois são reveladas através de reações colorimétricas após o período de incubação. O equipamento faz leituras óticas a cada 15 minutos para medir a formação/intensidade da cor de cada poço. O *software* do equipamento compara os resultados com uma base de dados e identifica os microrganismos, sendo esta identificação acompanhada por um valor em percentagem que representa a confiança do resultado obtido.

As cartas de TSA contêm poços com diferentes concentrações de antibióticos, permitindo determinar a suscetibilidade dos microrganismos, através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) (Michalik, 2017). Para uso destas cartas, é preparada uma nova suspensão a partir da suspensão anteriormente referida (para ID) e é pipetado um determinado volume conforme a carta de TSA a utilizar. As cartas TSA são específicas para determinados grupos de microrganismos e estão descritos na Tabela XI. Não há cartas de TSA para os microrganismos das cartas de identificação NH e ANC, pelo que, no caso de serem identificados algum destes microrganismos, o TSA é realizado manualmente.

**Tabela XI** - Cartas de TSA disponíveis no Setor de Microbiologia e respetivos microrganismos a que se destinam.

Carta de TSA	Grupo de microrganismos
355	<i>Enterobacteriaceae</i>
373	<i>Pseudomonaceae</i>
648	<i>Staphylococcus sp.</i>
586	<i>Enterococcus sp.</i> e <i>Streptococcus</i> $\beta$ ou $\gamma$ -hemolíticos (hemólise completa ou ausência de hemólise, respetivamente)
ST-03	<i>Streptococcus</i> $\alpha$ -hemolíticos (hemólise parcial)
YS08	Leveduras

Através de uma análise algorítmica, do *software* do equipamento, o CMI é determinado com base no crescimento microbiano em concentrações crescentes dos diferentes antibióticos da carta. Assim, e de acordo com as normas da EUCAST (do inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), define-se o antibiograma, onde são identificados os fármacos para os quais o microrganismo é resistente ou suscetível.

#### 6.4.4. TSA manuais: Método de Kirby-Bauer e E-test

O método de *Kirby-Bauer* ou método por difusão em disco é um dos métodos mais comuns e mais usados pelos laboratórios clínicos para fazer TSA. É um método prático e versátil, testando diferentes antibióticos, não requer equipamentos especiais e é apropriado para a maioria das bactérias patogénicas (Giuliano *et al.*, 2019; EUCAST, 2021).

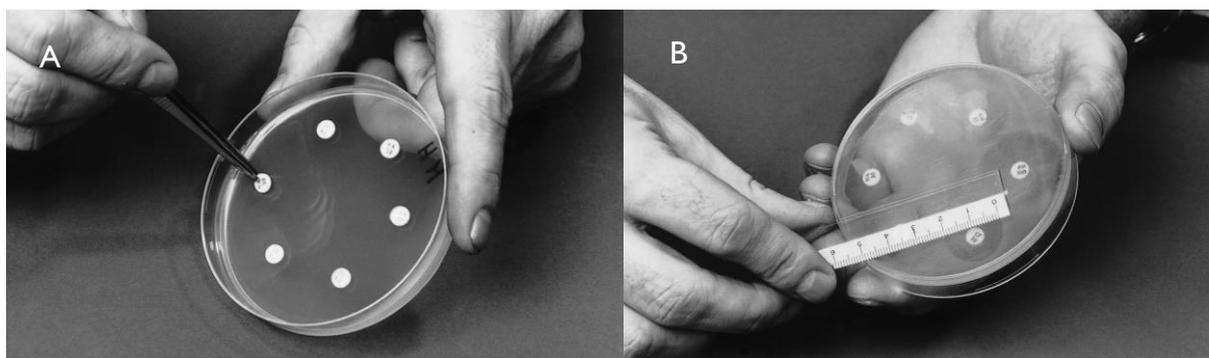
No setor de Microbiologia do IPOCFG é realizado o método estandardizado pela EUCAST, de modo a produzir resultados confiáveis e reprodutíveis.

No método de Kirby-Bauer, são usados discos de papel de filtro que contêm uma concentração conhecida de um determinado antibiótico, que são depositados na superfície de uma placa de gelose inoculada com uma suspensão padrão do microrganismo a testar (Zimbro *et al.*, 2009; Murray, 2015; Giuliano *et al.*, 2019). Na superfície, o antibiótico difunde-se pelo meio, estabelecendo um gradiente de concentração à volta do disco, sendo que a concentração mais alta de antibiótico é a que está mais próxima do disco. Após um período de incubação, as bactérias crescem em torno dos discos exceto onde a concentração de antibiótico é alta o suficiente para inibir o seu crescimento (Forbes *et al.*, 2007). Formam-se assim halos de inibição em torno dos discos, que serão medidos e comparados com as tabelas *Breakpoint* da EUCAST, determinando-se se o microrganismo é ou não sensível a um certo fármaco.

De acordo com as normas da EUCAST, o procedimento começa com a preparação de uma suspensão bacteriana em solução salina com uma densidade 0,5 McFarland (que corresponde entre 1 e  $2 \times 10^8$  UFC/mL) (EUCAST, 2021). Esta solução é semeada, pela técnica da sementeira em toalha (usando uma zaragatoa), em meio Mueller-Hinton (MHE) ou em meio Mueller-Hinton *Fastidious* (MHF) para bactérias fastidiosas, de modo a garantir uma distribuição uniforme do inóculo pela placa. O meio MHE é um meio não seletivo, que suporta o desenvolvimento da maioria das bactérias patogénicas, constituindo o meio padrão para a realização de TSA (Forbes *et al.*, 2007). O meio MHF permite efetuar TSA em organismos fastidiosos como *Streptococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium spp.*, etc. devido à adição de 5% de sangue de cavalo (EUCAST, 2021).

Por placa são aplicados no máximo 5 discos de antibióticos com a ajuda de uma pinça esterilizada (Figura 20A), de modo a não haver sobreposição de halos de inibição. As placas são incubadas a 37°C durante 16 a 20 horas. Após este tempo, os halos de inibição formados são medidos em milímetros com o auxílio de uma régua (Figura 20B) e são consultadas as tabelas *Breakpoint* da EUCAST para classificar o microrganismo como suscetível ou resistente aos antibióticos correspondentes.

No setor de Microbiologia do IPOCFG, este método é feito quando não há cartas de TSA disponíveis (como por exemplo para os organismos das cartas de identificação NH e ANC) ou quando se quer testar a suscetibilidade a um determinado antibiótico ou antibióticos que não estão incluídos nas cartas de TSA do sistema *Vitek 2 Compact 15*.



**Figura 20** - Método Kirby-Bauer e leitura de resultados. A – Colocação dos discos de papel de filtro no meio MHE. Na imagem estão 6 discos de papel, no entanto no setor de Microbiologia só são colocados no máximo 5 discos por placa.; B – Medição dos halos de inibição após incubação. Adaptado de Vindepitte et al., 2003.

A preparação do *E-test* é semelhante à do método Kirby-Bauer, em que é usada a mesma suspensão, o mesmo meio e as mesmas condições de incubação. No entanto, em vez de discos de papel de filtro, é colocado uma tira de reagente que contém concentrações crescentes de antibiótico ao longo da tira (Figura 21) (Giuliano et al., 2019).

A tira é colocada no centro da placa e, após incubação, o halo de inibição forma uma elipse que intersecta a tira. Este ponto de interseção representa a CMI (Forbes et al., 2007; Giuliano et al., 2019), que indicará resistência ou suscetibilidade do microrganismo ao antibiótico, também de acordo com as tabelas *Breakpoint* da EUCAST.



**Figura 21** - Tira de *E-test* em meio MHE. A seta representa o ponto de interseção e respectiva CMI. Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG

#### 6.4.5. Pesquisa de mecanismos de resistência

Segundo Forbes et al., (2007), alterações na estrutura ou na fisiologia da bactéria leva ao desenvolvimento de resistências a antibióticos, aos quais eram anteriormente suscetíveis.

Existem vários mecanismos de resistência descritos, sendo que o resultado final é sempre a perda parcial ou total da efetividade do antibiótico. No setor de Microbiologia do IPOCFG, destaca-se a pesquisa de Beta-Lactamases de Espectro Alargado (em inglês *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBL) e a produção de carbapenemases.

Os  $\beta$ -lactâmicos e as cefalosporinas são antibióticos que exercem o seu efeito ao ligarem-se às PBP e, conseqüentemente, inibirem a síntese da parede celular bacteriana. O método de resistência mais comum é a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases (como as ESBL), que inativam os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e as cefalosporinas de terceira e quarta geração ao

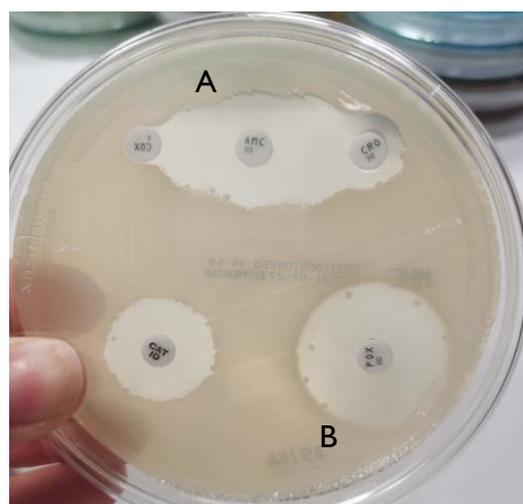
hidrolisarem o anel  $\beta$ -lactâmico, fazendo com que estes não se consigam ligar às PBP, permitindo que a síntese da parede celular prossiga (Forbes *et al.*, 2007; Wanger *et al.*, 2017; EUCAST, 2017).

A maioria das ESBL são enzimas adquiridas, codificadas por genes em plasmídeos, estrutura capaz de ser transmitida a outras bactérias suscetíveis, facilitando a disseminação da resistência. São frequentemente encontradas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Proteus mirabilis* (Coelho *et al.*, 2015; Wanger *et al.*, 2017; EUCAST, 2017). As carbapenemases são também  $\beta$ -lactamases adquiridas, com capacidades hidrolíticas versáteis e diferentes características bioquímicas, capazes de hidrolisar e inativar penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos, sendo comum nas enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae* (Coelho *et al.*, 2015; EUCAST, 2017).

No setor de Microbiologia do IPOCFG, as ESBL são pesquisadas, seguindo as diretrizes da EUCAST, após um teste de *screening*. Este consiste na detecção pelo sistema Vitek 2 de uma CMI  $>1$ mg/mL para duas cefalosporinas, ceftazidima e cefotaxina. Quando tal se verifica, é realizada então a pesquisa de ESBL através do Teste de Sinergismo em duplo disco, que avalia a atividade das cefalosporinas de terceira geração, ceftriaxona e cefotaxima, na presença de ácido clavulânico, um inibidor de  $\beta$ -lactamases. Para a realização deste teste, é preparado uma suspensão bacteriana de densidade 0,5 McFarland que é semeada em MHE pela técnica da sementeira em toalha. Posteriormente, é adicionado um disco de amoxicilina com ácido clavulânico no centro, cefotaxima a 20mm à esquerda do centro e ceftriaxona a 20mm à direita (Figura 22).

Na mesma placa é adicionado, afastado dos outros, um disco de faropenemo (um carbapenemo) para aferir a presença de carbapenemases. É colocado, também, um disco de cefoxitina (afastados dos outros), para pesquisa de  $\beta$ -lactamases do género AmpC, que são induzíveis na presença de  $\beta$ -lactâmicos e produzidas por microrganismos como *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis* ou *Serratia marcescens*, não sendo inibidas por inibidores das  $\beta$ -lactamases (Sousa, 2000). A placa é então incubada a 37°C durante 18 horas.

Após a incubação os resultados são interpretados. A presença de sinergismo entre os



**Figura 22** - Pesquisa de ESBL e carbapenemases pelo método de Kirby-Bauer em meio MHE. A - ESBL positivo (sinergismo); B - Faropenemo sensível (negativo para carbapenemases).  
Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

discos de cefotaxima, amoxicilina com ácido clavulânico e ceftriaxona indica a presença de ESBL (Figura 22A). A presença de halo de inibição em relação ao disco de faropenemo indica que a bactéria é sensível e não produz carbapenemases (Figura 22B), sendo que a ausência de halo significa que a bactéria é produtora de carbapenemases, pois é resistente ao faropenemo. Um halo de inibição <19mm para a cefoxitina poderá indicar uma elevada expressão de AmpC (EUCAST, 2021).

## 7. Controlo de Qualidade

Conforme referido no capítulo I, o controlo de qualidade é de extrema importância, de modo a assegurar resultados corretos, confiáveis e fidedignos que reflitam a situação clínica dos doentes.

No SPC do IPOCFG é também efetuado o controlo de qualidade interno e externo. O CQI é efetuado diariamente nos setores da Imunologia/Hormonologia, da Química Clínica e da Hematologia, normalmente antes do serviço começar, ou seja, antes de serem processadas as amostras. Este é semelhante nos três setores, em que os controlos internos são analisados em todos os equipamentos e processados como amostras normais, apresentando para cada parâmetro três níveis: normal, patológico alto e baixo.

Os resultados obtidos são apresentados em gráficos de *Levey-Jennings* e interpretados consoante as regras de *Westgard*, e devem-se aproximar dum dado intervalo de referência. Caso alguma regra seja transposta, é averiguado o sucedido e corrige-se, repetindo o controlo, colocando um novo ou calibrando o equipamento.

No setor de Microbiologia, o CQI engloba o controlo regular da esterilidade da solução salina, usada para realizar testes de identificação e de suscetibilidade a antibióticos (inoculando-a numa placa de gelose de sangue e posterior incubação) e a monitorização diária da temperatura dos frigoríficos e das estufas.

Relativamente ao CQE, todos os setores participam num programa nacional, realizado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e num internacional, o *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), com exceção do setor de Microbiologia, que participa no *United Kingdom National External Quality Assurance Scheme* (NEQAS).

## Conclusão

Durante o estágio no LACUC pude sentir-me útil, numa altura difícil, devido à COVID-19, em que toda a ajuda era bem-vinda. A minha experiência no LACUC foi deveras positiva. Aprendi a ganhar confiança em mim mesma, a acreditar que era capaz e a reduzir o nervosismo que tanto sentia por ser o meu primeiro estágio. O sentido de responsabilidade, capacidade de organização, profissionalismo e o trabalhar em equipa deram-me bases muito importantes que levo comigo para a minha vida profissional.

A possibilidade de estagiar no IPO chegou de forma tão inesperada que quase parecia um milagre, tendo em conta o panorama dos laboratórios de Análises Clínicas em Coimbra na altura da pandemia, com todos a fecharem as portas a estagiários. Pude de facto aprender muito e acompanhar casos clínicos pouco comuns que provavelmente não veria noutra laboratório e considero que isso foi um dos pontos fortes do meu estágio no IPO.

A confiança em mim mesma, adquirida no LACUC, ajudou-me a integrar na rotina de trabalho do SPC-IPOCFG, ganhando rapidamente autonomia em certos setores.

O setor de Imunologia foi o que eu mais gostei, tanto pela quantidade e fluxo de trabalho como pela complexidade dos equipamentos e parâmetros analisados. Para compreender melhor e complementar os conhecimentos adquiridos no setor, teria sido vantajoso ter tido a unidade curricular de Endocrinologia a tempo do meu estágio. O setor de Hematologia permitiu-me consolidar muitos conhecimentos adquiridos na unidade curricular de Hematologia sendo que a observação de esfregaços sanguíneos, muitos deles atípicos, foi o mais interessante.

No geral, apesar de ter sido uns meses muito trabalhosos, pude aprender muito com profissionais e colegas extraordinários, que me orientaram, deram apoio e ajudaram-me muito. Terminei esta longa etapa com a certeza de que dei o meu melhor e de certo modo, orgulhosa de mim mesma e com vontade de aprender mais e de continuar a pôr em prática tudo o que aprendi.



## Bibliografia

- ADEWOYIN, AS; NWOGOH, B. - Peripheral Blood Film - A Review. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*. Vol. 12, 2 (2014) p. 71-79.
- AGGARWAL, Swati; NAYAK, Deepak M.; MANOHAR, Chethan - Discrepancy in Optical & Mechanical Method in Coagulation Tests in a Turbid Sample. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. Vol. 30, Suppl. 1 (2014) p. 402-404.
- ALEMU, Yared; ALEMAYEHU, Atomsa; SAHLEMARIAM, Zewdneh - Hematology: Lecture Notes for Medical Laboratory Students. *Jimma University, in collaboration with the Ethiopia Public Health Training Initiative, The Carter Center, the Ethiopia Ministry of Health, and the Ethiopia Ministry of Education*. 2006. [Acedido a 25 de março de 2021]. Disponível na Internet: [https://www.cartercenter.org/resources/pdfs/health/ephiti/library/lecture\\_notes/med\\_lab\\_tech\\_students/ln\\_hematology\\_mlt\\_final.pdf](https://www.cartercenter.org/resources/pdfs/health/ephiti/library/lecture_notes/med_lab_tech_students/ln_hematology_mlt_final.pdf)
- ALI, Tanveer et al. - Mutation-Based Antibiotic Resistance Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Pharmaceuticals*. Vol. 14, 5: 420 (2021) p. 1-11.
- ANDREYCHUK, D. B. et al. - Armoured exogenous internal control for real-time PCR diagnosis of avian influenza. *Avian Pathology*. Vol. 48, 5 (2019) p. 492-498.
- ANDRADE, Fernanda Miguel de et al - Perfil hematológico e qualidade de vida de crianças submetidas a quimioterapia antineoplásica. *Temas em Saúde*. Vol. 18, 2 (2018) p. 260-288.
- ARNOUT, J. - Antiphospholipid Syndrome: Diagnostic Aspects of Lupus Anticoagulants. *Thromb Haemost*. Vol. 86 (2001) p. 83-91.
- BACALL, Nydia S. - Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. Vol. 31, 4 (2009) p. 218-220.
- BAIN, Barbara J. - Preparation and Staining Methods for Blood and Bone Marrow Films. In: BAIN, Barbara J; LAFFAN, Michael A.; BATES, Imelda. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 12a Ed. United Kingdom: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-7020-6696-2. p.50-60.
- BANFI, Giuseppe; SALVAGNO, Gian Luca; LIPPI, Giuseppe - The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Vol. 45, 5 (2007) p. 565-576.

- BELOUZARD, Sandrine *et al.* - Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses*. Vol. 4, 6 (2012) p. 1011-1033.
- BERENSMEIER, Sonja - Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 73, 3 (2006) p. 495-504.
- BHATT, Varsha; SALEEM, Abdus - Review: Drug-Induced Neutropenia – Pathophysiology, Clinical Features, and Management. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. Vol. 34, 2 (2004) p. 131-137.
- BOCKEL, David van *et al.* - Evaluation of Commercially Available Viral Transport Medium (VTM) for SARS-CoV-2 Inactivation and use in Point-of-Care (POC) Testing. *Viruses*. Vol. 12, 1: 1208 (2020) p. 1-11.
- BOOM, R. *et al.* - Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 28, 3 (1990) p. 495-503.
- BOOPATHI, Subramanian; POMA, Adolfo B.; KOLANDAIVEL, Ponmalai - Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. Vol. 39, 9 (2021) p. 3409-3418.
- BRIGGS, Carol; BAIN, Barbara J. - Basic Haematological Techniques. In: BAIN, Barbara J; LAFFAN, Michael A.; BATES, Imelda. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 12<sup>a</sup> Ed. United Kingdom: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-7020-6696-2. p.18-49.
- BUSTIN, Stephen A.; MUELLER, Reinhold - Real-time reverse transcription PCR (qRT PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*. Vol. 109, 4 (2005) p. 365-379.
- BUTRAGO, Raquel Lamounier - A Importância do exame Hemograma Completo para o Diagnóstico de Doenças Hematológicas. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia, 2015. Artigo apresentado pela Academia de Ciência e Tecnologia, como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Hematologia Clínica e Laboratorial. [Acedido a 2 de maio de 2021]. Disponível na Internet: [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/temas\\_relacionados/1.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/temas_relacionados/1.pdf)
- CAI, Dongyang *et al.* - Capacity of rTth polymerase to detect RNA in the presence of various inhibitors. *PLoS ONE* 13(1), 2018.
- CELKAN, Tülin Tiraje - What does a hemogram say to us? *Turkish Archives of Pediatrics*. Vol. 55, 2 (2020) p. 103-116.

- CHA, Choong-Hwan *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. *American Journal of Clinical Pathology*. Vol. 131, 2 (2009) p. 189-194.
- CHAVES, Carla D. - Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Vol. 46, 5 (2010).
- COELHO, Isabelle Carvalho *et al.* - Avaliação da suscetibilidade da *Klebsiella pneumoniae* aos beta-lactâmicos. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*. Vol. 5, 2 (2015) p. 79-83.
- CONCEIÇÃO, Cláudia *et al.* - COVID-19: diagnóstico molecular de infecção por SARS-CoV-2. [Em linha]. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade NOVA de Lisboa, 2020. [Acedido a 2 de março de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ihmt.unl.pt/covid-19-diagnostico-molecular-de-infecao-por-sars-cov-2/>
- CRAWFORD, Jeffrey; DALE, David C.; LYMAN, Gary H. - Chemotherapy-Induced Neutropenia: Risks, Consequences, and New Directions for Its Management. *Cancer (American Cancer Society Journals)*. Vol. 100, 2 (2003) p. 228-237.
- CRAWFORD, Jeffrey - Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Neutropenia. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. Vol. 11, 8 (2013) p. 514-517.
- CRISTINO, José Melo – Staphylococcus. In: FERREIRA, Wanda F. Canas; DE SOUSA, João Carlos. *Microbiologia: Volume 2*. 1ª Ed. Lisboa: LIDEL- edições técnicas, Lda, 2000. ISBN 978-972-757-112-3. p. 39-49.
- DEVATA, Sumana – Thrombocytopenia. In: SAINT, Sanjay; CHOPRA, Vineet. *The Saint-Chopra Guide to Inpatient Medicine*. 4ª Ed: Oxford University Press, 2018. ISBN 9780190862800.
- DEY, Pranab - Fluorescent In Situ Hybridization Techniques in Pathology: Principle, Technique and Applications. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. 1ª Ed. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2018. ISBN 978-981-10-8251-1. p. 213-220.
- DICKENS, Elena; AHMED, Samreen - Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery - Cancer Treatment*. Vol. 36, 3 (2018) p. 134-138.
- DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE – Orientação n.º 015/2020 de 23 de março de 2020, atualizada a 24 de abril de 2020. [Acedido a 22 de setembro de 2021]. Disponível na Internet:

<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0152020-de-23032020-pdf.aspx>

ESPY, M. J. *et al.* - Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19, 1 (2006) p. 165-256.

EUCAST - EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versão 2.0 (2017). [Acedido a 11 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf)

EUCAST - Antimicrobial susceptibility testing: EUCAST disk diffusion method. Versão 9.0 (2021). [Acedido a 8 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: [https://eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](https://eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/)

FITZGERALD, Daniel W.; STERLING, Timothy R.; HAAS, David W. - *Mycobacterium tuberculosis*. In: BENNETT, John E. *et al.* *Mandel, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8ª Ed. New York: Elsevier Saunders, 2015. ISBN 978-1-4557-4801-3. p. 2787-2818e5.

FONSECA, Ana Bruschy *et al.* - Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia. *Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção (2004).

FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – *Baily & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12ª Ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. ISBN 978-0-323-03065-6.

FORD, J. – Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*. Vol. 35, 3 (2013) p. 351-357.

FRANCO, Rendrik F. - Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise. *Medicina (Ribeirão Preto)*. Vol. 34, 3/4 (2001) p. 229-237.

GIULIANO, Christopher; PATEL, Chandni R.; KALE-PRADHAN, Pramodini B. - A Guide to Bacterial Culture Identification And Results Interpretation. *Pharmacy and Therapeutics*. Vol. 44, 4 (2019) p. 192-200.

GREER, John P. *et al.* - *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11ª Ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003. ISBN 978-0-781-73650-3.

GUIMARÃES, Alexandre Costa *et al.* - O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. *Rev HCPA*. Vol. 31, 1 (2011) p. 66-72.

- HAAS, Dionei Joaquim; TORRES, Ana Caroline Doyle - Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. *Revista Científica de Medicina Veterinária*. Vol. 26 (2016) p. 1-15.
- HASSAN, Bassam A. R.; YUSOFF, Zuraidah B. M.; OTHMAN, Saad B. - Association of Neutropenia Onset and Severity with Chemotherapy Regimens and Schedules. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Vol. 12, 6 (2011) p. 1425-1428.
- HASSAN, Bassam A. R.; YUSOFF, Zuraidah B. M.; OTHMAN, Saad B. - A Close Look at Neutropenia among Cancer Patients - Risk Factor and Management. In: RANGEL, Letícia; SILVA, Ian Victor. *Updates on Cancer Treatment*. IntechOpen, 2015. ISBN 978-953-51-7259-8, p. 1-24.
- HASSAN, Mojibade N.; WALLER, Edmund K. - Treating Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia: Is It Time for Oncologists to Use Thrombopoietin Agonists? *Oncology (Williston Park)*. Vol. 29, 4 (2015) p. 295-296.
- HOFFBRAND, Victor A.; MOSS, Paul A. H. - Hoffbrand's *Essential Haematology*. 7<sup>a</sup> Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.
- HUMPHREYS, H. – *Staphylococcus*. In: GREENWOOD, David et al. *Medical microbiology: A guide to microbial infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory diagnosis and Control*. 18<sup>a</sup> Ed. Churchill Livingstone, 2012. ISBN 9780702040894, p.176-182.
- KALENIC, Smilja; BUDIMIR, Ana - The role of the microbiology laboratory in healthcare-associated infection prevention. *International Journal of Infection Control*. Vol. 5, 2 (2009).
- KAYSER, Fritz H. et al. – *Medical Microbiology*. New York: Thieme, 2005. ISBN 3-13-131991-7.
- KEOHANE, Elaine M.; OTTO, Catherine N.; WALENGA, Jeanine M. - *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. 6<sup>a</sup> Ed. St. Louis: Elsevier, 2020. ISBN 978-0-323-53045-3.
- KUMARI, Pilli H. P.; RANI, Purimitla U.; VIJAYALAKSHMI, Payala - Evaluation of microbiological profile and antibiogram of aerobic bacteria isolated from pus samples. *Journal of Medical & Allied Sciences*. Vol. 8, 1 (2018) p. 26-35.
- KUTER, David J. - Managing Thrombocytopenia Associated With Cancer Chemotherapy. *Oncology*. Vol. 29, 4 (2015).

- LAURENZO, David; MOUSA, Shaker A. - Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Tropica*. Vol. 119, 1 (2011) p. 5-10.
- LECTURIO - Coagulation Studies. Leipzig: Lecturio [Acedido a 8 de julho de 2021] Disponível na Internet: <https://www.lecturio.com/concepts/coagulation-studies/>
- LEVY, Carlos E. et al. - Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. 1ª Ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. [Acedido a 26 de agosto de 2020] Disponível na Internet: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_microbiologia\\_completo.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf)
- LEVY, Jerrold H. et al. - Clinical Use of the Activated Partial Thromboplastin Time and Prothrombin Time for Screening: A Review of the Literature and Current Guidelines for Testing. *Clinics in Laboratory Medicine*. Vol. 34, 3 (2014) p. 453-477.
- LI, Geng et al. - Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*. Vol. 92, 4 (2020) p. 424-432.
- LIBEER, Jean-Claude - External quality assurance programmes in medical laboratories. *Accreditation and Quality Assurance*. Vol. 6 (2001) p. 151-153.
- LIMA, Taiza M. et al. - Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. Vol. 8, 2 (2017) p. 65-76.
- LIN, Judith C. - Approach to anemia in the adult and child. In: HOFFMAN, Ronald et al. *Hematology, Basic Principles and Practice*. 7ª Ed. Filadélfia: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-323-35762-3, p. 458-467.
- LIPPI, Giuseppe et al. - Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. Vol. 53, 3 (2015) p. 357-370.
- MACKAY, I. M. - Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 10, 3 (2004) p. 190-212.
- MAGADIA, Raul R.; WEINSTEIN, Melvin P. - Laboratory Diagnosis of Bacteremia and Fungemia. *Infectious Disease Clinics of North America*. Vol. 15, 4 (2001) p. 1009-1024.
- MAGALHÃES, S. - SARS-CoV-2: Diagnóstico Laboratorial. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. Vol. 9, 1 (2020) p. 32-37.

- MALIN, Riikka et al. - Erythrocyte Sedimentation Rate by the Test-I Analyzer. *Clinical Chemistry*. Vol. 46, 6 (2000).
- MARTELLI, Anderson - Gestão da Qualidade em Laboratórios de Análises Clínicas. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. Vol. 13 (ESP), (2001) p. 363-368.
- MCCALL, Keith B. - Spectrophotometric Determination of Total Hemoglobin in Plasma. *Analytical Chemistry*. Vol. 28, 2 (1956).
- MCGOOKIN, R. - RNA Extraction by the Guanidine Thiocyanate Procedure. In: WALKER, John M. *Methods in Molecular Biology Volume 2: Nucleic Acids*. New Jersey: The Humana Press Inc., 1984. ISBN 0-89603-064-4, p. 113-116.
- MCKENZIE, Shirlyn B.; WILLIAMS, J. Lynne - Clinical Laboratory Hematology. 3ª Ed. New Jersey: Pearson Education, Inc., 2015. ISBN 978-0-13-307601-1.
- MICHALIK, Steve - Como é que o VITEK® 2 cria valores de CMI? *Biomérieux*, 2017. [Acedido a 8 de setembro de 202] Disponível na Internet: <https://www.biomerieux-microbio.com/pt-pt/formacao/como-e-que-o-vitek-2-cria-valores-de-cmi/>
- MIJOVSKI, Mojca B. - Advances in monitoring anticoagulant therapy. *Advances in Clinical Chemistry*. Vol. 90, 5 (2019) p. 197-213.
- MILLER, J. et al. - A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*. Vol 67, 6 (2018) p. e1-e94.
- MISHRA, Sachin K.; MISHRA, Sonali - Comparative Evaluation of Ziehl-Neelsen and Kinyoun Staining in the Diagnosis of Clinically Suspected Cases of Pulmonary Tuberculosis. *Asian Pacific Journal of Health Sciences*. Vol. 6, 4 (2019) p. 37-42.
- MONTOYA, Libby - Managing Hematologic Toxicities in the Oncology Patient. *Journal of Infusion Nursing*. Vol. 30, 3 (2007) p. 168-172.
- MURRAY, Patrick R. - The Clinician and the Microbiology Laboratory. In: BENNETT, John E. et al. *Mandel, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8ª Ed. New York: Elsevier Saunders, 2015. ISBN 978-1-4557-4801-3, p. 191-223.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - Medical Microbiology. 8ª Ed. Filadélfia: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-323-29956-5.

- NATH, Joginder; JOHNSON, Kirby L. - A Review of Fluorescence in Situ Hybridization (FISH): Current Status and Future Prospects. *Biotechnic & Histochemistry*. Vol. 75, 2 (1999) p. 54-78.
- NI, Wentao *et al.* - Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Critical Care*. Vol. 24, 422 (2020).
- NOVAIS, Caroline M.; PIRES-ALVES, Melissa - PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. Edição 33 (2004).
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products (Annex 4). *WHO Technical Report, Series No. 924 (2004)* [Acedido a 15 de março de 2021] Disponível na Internet: <https://www.who.int/publications/m/item /WHO-TRS924-Annex4>
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - Diagnostic testing for SARS-CoV-2: Interim guidance. OMS (2020) [Acedido a 8 de fevereiro de 2021] Disponível na Internet: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
- PAL, Nita *et al.* - Optimum Time to Detection of Bacteria and Yeast Species with BACTEC 9120 Culture System from Blood and Sterile Body Fluids. *Journal of Laboratory Physicians*. Vol. 1, 2 (2009) p. 69-72.
- PALTA, Sanjeev; SAROA, Richa; PALTA, Anshu - Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*. Vol. 58, 5 (2014) p. 515-523.
- PCR COMPENDIUM - Real-Time PCR. PCR Compendium [Acedido a 28 de março de 2021] Disponível na Internet: <https://pcrcompendium.wordpress.com/ realtimepcr/>
- PEZZLO, Marie - Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections: Guidelines, Challenges, and Innovations. *Clinical Microbiology Newsletter*. Vol. 36, 12 (2014) p. 87-93.
- PLEBANI, Mario *et al.* - The TEST I Automated System: A New Method for Measuring the Erythrocyte Sedimentation Rate. *American Journal of Clinical Pathology*. Vol. 110, 3 (1998) p. 334-340.
- PUBLIC HEALTH ENGLAND - Understanding cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR - A guide for health protection teams. *Public Health England*. Versão 1 (2020). [Acedido a 2 de abril de 2021] Disponível na Internet: <https://www.gov.uk/government/publications/cycle-threshold-ct-in-sars-cov-2-rt-pcr>

- RAZZAGHDOUST, Abolfazl; MOFID, Bahram; ZANGENEH, Masoumeh - Predicting chemotherapy-induced thrombocytopenia in cancer patients with solid tumors or lymphoma. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. Vol. 26, 3 (2020) p. 587-594.
- RIUL, Sueli; AGUILLAR, Olga M. - Quimioterapia Antineoplásica: revisão da literatura. *Revista Mineira de Enfermagem*. Vol 3 (1/2) (1999) p. 60-67.
- RODAK, Bernadette; CARR, Jacqueline - Clinical Hematology Atlas. 5ª Ed. St. Louis: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-32249-2.
- ROLSTON, Kenneth V. I. - The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. *Current Opinion in Oncology*. Vol. 13, 4 (2001) p. 218-223.
- RUCKDESCHEL, J.C. et al. - Respiratory infections in patients with cancer. In: KUFFE, D. W. et al. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6ª Ed. Hamilton: BC Decker, 2003. [Acedido a 31 de agosto de 2021]. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13540/>
- SANTOS, V. M.; DA CUNHA, S. F.; DA CUNHA, D. F. - Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Revista da Associação Médica Brasileira*. Vol. 46, 3 (2000) p. 232-236.
- SANTOS, Christiane S. S. et al. - Controle de qualidade no Laboratório de Análises Clínicas na Fase Analítica: A Segurança dos Resultados. *Brazilian Journal of Health Review*. Vol. 3, 4 (2020) p. 8512-8523.
- SELLNER, Loryn N.; TURBETT, Gavin R. - Comparison of Three RT-PCR Methods. *BioTechniques (Short Technical Reports)*. Vol. 25, 2 (1998) p. 230-234.
- SHARMA, A.; LOKESHWAR, N. - Febrile neutropenia in haematology malignancies. *Journal of Postgraduate Medicine*. Vol. 51, 1 (2005).
- SHETTY, Anup K. et al. - A comparative study of conventional and BACTEC 9120 blood culture methods. *Muller Journal of Medical Sciences and Research*. Vol. 2, 2 (2011) p. 8-13.
- SHRIVASTAVA, Vikas et al. - Evaluation of haematological and volume, conductivity and scatter parameters of leucocytes for aetiological diagnosis of undifferentiated fevers. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 111, 12 (2018) p. 546-554.

- SHOAIB, Muhammad *et al.* - A Mini-Review on Commonly used Biochemical Tests for Identification of Bacteria. *International Journal of Research Publications*. Vol. 54, 1 (2020).
- SIMERVILLE, Jeff A.; MAXTED, William C.; PAHIRA, John J. - Urinalysis: A Comprehensive Review. *American Family Physician*. Vol. 71, 6 (2005) p. 1153-1162.
- SINGANAYAGAM, Anika *et al.* - Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveillance*. Vol. 25, 32 (2020).
- SLATER, Robert J. - The Extraction of Total RNA by the Detergent and Phenol Method. In: WALKER, John M. *Methods in Molecular Biology Volume 2: Nucleic Acids*. New Jersey: The Humana Press Inc., 1984. ISBN 0-89603-064-4, p. 101-108.
- SOUSA, João Carlos F. de – Enterobacteriaceae. In: FERREIRA, Wanda F. Canas; DE SOUSA, João Carlos. *Microbiologia: Volume 2*. 1ª Ed. Lisboa: LIDEL- edições técnicas, Lda, 2000. ISBN 978-972-757-112-3, p. 99-109.
- THAIRU, Yunusa; NASIR, Idris; USMAN, Yahaya - Laboratory Perspective of Gram Staining and its Significance in Investigations of Infectious Diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*. Vol. 1, 4 (2014) p. 168-174.
- TORTORA, Gerard; FUNKE, Berdell; CASE, Christine – Microbiologia. 12ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2017. ISBN 978-85-8271-354-9.
- VANDEPITTE, J. *et al.* - Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2ª Ed. Geneva: Organização Mundial de Saúde, 2003. [Acedido a 3 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42696>
- VARMA-BASIL, Mandira; BOSE, Mridula - Mapping the Footprints of Nontuberculous Mycobacteria: A Diagnostic Dilemma. In: Velayati Ali A.; FARNIA, Parissa. *Nontuberculous Mycobacteria (NTM): Microbiological, Clinical and Geographical Distribution*. Academic Press, 2019. ISBN 9780128146927, p. 155-175.
- VILLELA, Gleize; FERRAZOLI, Lucilaine - Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. Atualização a 26 de novembro de 2020. [Acedido a 16 de agosto de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-7-deteccao-e-identificacao-de-micobacterias-de-importancia-medica/view>

- VIRK, Harpreet *et al.* - Utility of cell population data (VCS parameters) as a rapid screening tool for Acute Myeloid Leukemia (AML) in resource-constrained laboratories. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Vol. 33, 2 (2018).
- WAHED, Amer; QUESADA, Andres; DASGUPTA, Amitava - Hematology and Coagulation - A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice. 2<sup>a</sup> Ed. Elsevier Inc. (Academic Press), 2020. ISBN 978-0-12-814964-5.
- WAN, Thomas; MA, Edmond - The role of FISH in hematologic cancer. *International Journal of Hematologic Oncology*. Vol. 1, 1 (2012) p. 71-86.
- WANGER, A. *et al.* - Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs. In: Wanger, A. *et al.* *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*. Elsevier Inc., 2017. ISBN 978-0-12-805351-5.
- WEYCKER, Derek *et al.* - Risk and consequences of chemotherapy induced thrombocytopenia in US clinical practice. *BMC Cancer*. Vol. 19, 151 (2019).
- WIELDERS, C. L. *et al.* - *mecA* Gene Is Widely Disseminated in *Staphylococcus aureus* Population. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 40, 11 (2002) p. 3970–3975.
- WORONZOFF-DASHKOFF, Kristine K. - The Wright-Giemsa stain: Secrets revealed. *Clinics in Laboratory Medicine*. Vol. 22, 1 (2002) p. 15-23.
- YOUNG, Jennifer L.; SOPER, David E. - Urinalysis and urinary tract infection: update for clinicians. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. Vol. 9 (2001) p. 249-255.
- ZIMBRO, Mary J. *et al.* - Difco & BBL Manual - Manual of Microbiological Culture Media. 2<sup>a</sup> Ed. Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN 0-9727207-1-5.



## Anexos

### Anexo I

**Tabela VIII** - Equipamentos e respectivos métodos de análises e parâmetros avaliados no Setor de Imunologia do SPC-IPOCFG.

<b>Equipamento</b>	<b>Método de análises (imunoenaios com detecção por):</b>	<b>Parâmetros avaliados (exemplos)</b>
<i>Immulate 2000 XPi</i> da <b>Siemens®</b>	Quimiofluorescência	Alfa-fetoproteína; Antigénio Carcinoembrionário; Antigénio Específico da Próstata; Beta-2 Microglobulina; Eritropoietina; Gastrina; Gonadotrofina Coriônica Humana; Hormona Adrenocorticotrófica; Hormona do Crescimento; Imunoglobulina Estimuladora da Tireoide.
<i>Advia Centaur XPT</i> da <b>Siemens®</b>		Estradiol; Ferritina; Hormona Estimuladora da Tireoide (TSH); Hormona Foliculo-Estimulante; Hormona Luteínica; Oncoproteína HER-2; Paratormona; Prolactina; Progesterona; Testosterona; Vitamina D; Creatina Cinase; Mioglobina; Troponina Cardíaca de Alta Sensibilidade.
<i>Cobas 6000 e601</i> da <b>Roche Diagnostics®</b>	Electroquimiofluorescência	Ácido Fólico; Anticorpos Anti-recetores da TSH; Maracador tumoral CA 125, 72.4 e 19.9; Cortisol; Insulina; Proteína HE4; Tiroglobulina; Triiodotironina (T3) e T3 livre; Tiroxina (T4) e T4 livre; Vitamina B12.
<i>Brahms Kryptor Gold</i> da <b>ThermoFisher Scientific®</b>	Fluorescência por <i>quenching</i> (európio)	Marcador Tumoral CA 15.3; Cromogranina A; Enolase Neuro-Específica; Procalcitonina;
<i>Atellica NEPH 630</i> da <b>Siemens Healthineers®</b>	Nefelometria	Proteína C-reativa; Procalcitonina; Imunoglobulinas IgA, IgM, IgG; Transferrina.

<p><i>IDS-iSYS</i> da <b>Immunodiagnostic Systems®</b></p>	<p>Quimioluminiscência</p>	<p>Renina; Aldosterona; Testosterona; Serologia infecciosa (Toxoplasmose, EBV etc.)</p>
<p><i>Optilite</i> da <b>Binding Site®</b></p>	<p>Turbidimetria</p>	<p>Albumina; Beta-2-microglobulina; Haptoglobina; Cistatina C; Transferrina; Complemento (C1, C3, C4).</p>