



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Viviana Filipa Vieira Pedra

RELATÓRIO DE ESTÁGIO  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular realizado no Serviço de Patologia  
Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra no âmbito  
do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora  
Gabriela Jorge da Silva e pela Dra. Cristiana Canha apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Viviana Filipa Vieira Pedra

Relatório de Estágio Curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e pela Dra. Cristiana Canha apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023





## **AGRADECIMENTOS**

Terminada mais uma etapa, esta de dois anos, e já se manifesta a típica nostalgia dos momentos vividos. Resta-me agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu sucesso e sem os quais não teria chegado até aqui.

Agradeço em primeiro lugar à Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, a minha orientadora interna, por toda a orientação, disponibilidade demonstrada, assim como pelo conhecimento transmitido e rigor exigidos.

Agradeço à Dra. Alice Mendes e à Dra. Cristiana Canha, minha orientadora externa, por todo o apoio e auxílio que me prestaram. Reconheço verdadeiramente o esforço feito para que pudesse ter a melhor e mais completa experiência de estágio. Agradeço também à equipa do SPC-CHUC que me acolheu, transmitiu novos conhecimentos e esclareceu quaisquer dúvidas que tivesse.

Agradeço à minha colega de estágio, a Inês, por ter feito comigo este percurso tão frutuoso, mas difícil.

Agradeço ao meu namorado pela motivação e por me ter acompanhado ao longo de mais uma etapa da minha vida. Obrigada por todo o amor.

Agradeço em especial à minha mãe, por me amparar as quedas e nunca me deixar desistir. Por sempre me incentivar a ultrapassar cada batalha, mesmo com medo, seguindo em frente. Sem ela nada disto teria sido possível!

Por fim, agradeço à minha família, por me terem ensinado que nada na vida se conquista sem esforço e que no final, tudo vale a pena.

Obrigada por tudo!



## RESUMO

As análises clínicas são essenciais no diagnóstico, prognóstico e monitorização terapêutica dos doentes, como são decisivas na prevenção e acompanhamento dos respetivos com as mais variadas patologias. Assim, as análises clínicas assumem um importante papel a nível individual e, igualmente, a nível de saúde comunitária.

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra culmina com a realização de um estágio curricular cujo objetivo é adquirir formação no contexto de trabalho real de um Laboratório Clínico; aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos nas diversas unidades curriculares do curso; assim como conquistar competências científicas na área do diagnóstico laboratorial nas diferentes áreas.

O presente relatório relata as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular que decorreu entre os meses de janeiro e de junho de 2023 no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC).

Neste documento são abordadas as valências de Hematologia, Microbiologia, Imunologia e Bioquímica, no entanto são aprofundadas apenas duas, Hematologia e Microbiologia. Aqui realço a importância dos diferentes exames laboratoriais, equipamentos e metodologias, a interpretação e validação dos resultados, assim como a sua inter-relação com outros resultados, e que conjuntamente assumem um importante papel no diagnóstico clínico.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas; Hematologia; Microbiologia; exames laboratoriais; diagnóstico clínico.



## **ABSTRACT**

Clinical analysis are essential in the diagnosis, prognosis, and therapeutic monitoring of patients, as they are decisive in the prevention and follow-up of those with the most varied pathologies. In this context, clinical analysis acquires an important role at the individual level and, equally, at the extent of community health.

The Master's Course in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra culminates in a curricular internship whose objective is to acquire training in the context of real work in a Clinical Laboratory; apply and consolidate the knowledge acquired in the various curricular units of the course; as well as gaining scientific skills in the area of laboratory diagnosis in distinctive fields.

This document reports the activities developed during the curricular internship, carried out within the scope of Master Course in Clinical Analyses of Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The internship occurred between January and June 2023, at the Clinical Pathology Service of Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC).

In the present document, diverse areas of Clinical Analysis, like Haematology, Microbiology, Immunology, and Biochemistry, are referred. However, only two are explained in depth, Haematology and Microbiology. Here, I emphasize the importance of distinct laboratory tests, equipment, and methodologies, the interpretation and validation of results, in addition to their relationship with other results, which all together play a relevant role in clinical diagnosis.

**Keywords:** Clinical Analysis; Haematology; Microbiology; laboratory tests; clinical diagnosis.

# ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS .....	x
ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO .....	2
3. CONTROLO DE QUALIDADE.....	3
4. HEMATOLOGIA.....	4
4.1 HEMOGRAMA.....	4
4.1.1 Série vermelha – Eritrograma .....	5
4.1.1.1 Série vermelha – Alterações quantitativas.....	6
4.1.1.2 Série vermelha – Alterações qualitativas.....	6
4.1.2 Série branca – Leucograma .....	9
4.1.2.1 Série branca – Alterações quantitativas.....	10
4.1.2.2 Série branca – Alterações qualitativas .....	11
4.1.3 Série plaquetar – Trombograma .....	13
4.1.3.1 Série plaquetar – Alterações quantitativas.....	13
4.1.3.2 Série plaquetar – Alterações qualitativas .....	14
4.2 VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO .....	15
4.3 HEMOSTASE.....	16
4.2.1 Método Coagulométrico.....	17
4.3.2 Método Imuno-turbidimétrico.....	21
4.3.3 Método Cromogénico .....	22
4.3.4 Tromboelastograma.....	22
4.4 CITOGENÉTICA .....	22
4.5 CASO CLÍNICO .....	24
5. IMUNOLOGIA .....	26
5.1 AUTOIMUNIDADE .....	26
5.2 IMUNOLOGIA/ IMUNOALERGOLOGIA.....	27
6. MICROBIOLOGIA.....	28
6.1 BACTERIOLOGIA.....	28
6.1.1 Diagnóstico Laboratorial.....	29
6.1.1.1 Exame Direto .....	29
6.1.1.2 Exame Cultural.....	29
6.1.1.3 Identificação .....	30
6.1.1.4 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA).....	31
6.1.2 Amostras .....	32
6.2 MICOBACTERIOLOGIA.....	39
6.2.1 Diagnóstico laboratorial .....	40
6.3 MICOLOGIA .....	43
6.4 SEROLOGIA .....	44
6.5 BIOLOGIA MOLECULAR .....	46

6.5.1	GeneXpert® (Cepheid).....	46
6.5.2	FilmArray® Torch.....	46
6.6	CASO CLÍNICO.....	47
7.	BIOQUÍMICA.....	51
8.	CONCLUSÃO.....	53
9.	BIBLIOGRAFIA.....	55
10.	ANEXOS.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de esferócitos .....	7
<b>Figura 2-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de dacriócitos .....	7
<b>Figura 3-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observam várias células em alvo.....	7
<b>Figura 4-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de drepanócitos .....	8
<b>Figura 5-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de acantócitos.....	8
<b>Figura 6-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de esquizócitos .....	8
<b>Figura 7-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de Corpúsculos de Howell-Jolly .....	9
<b>Figura 8-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença do pontilhado basófilo.....	9
<b>Figura 9-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de Corpúsculos de Pappenheimer .....	9
<b>Figura 10 -</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo hipersegmentado .....	11
<b>Figura 11-</b> Esfregaços de sangue periférico onde se observam neutrófilos hiposegmentados. A: núcleo em forma de amendoim. B: núcleo bilobado .....	11
<b>Figura 12-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo vacuolizado .....	12
<b>Figura 13-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observa um linfócito reativo .....	12
<b>Figura 14-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo com um Corpo de Döhle .....	12
<b>Figura 15-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo com granulação tóxica .....	12
<b>Figura 16-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observa o fenómeno de Satelismo plaquetar .....	15
<b>Figura 17-</b> Esfregaço de sangue periférico onde se observa uma plaqueta gigante .....	15
<b>Figura 18-</b> Esfregaço de sangue periférico corado pela coloração de May-Grunwald-Giemsa onde se observam mielócitos e metamielócitos neutrofilicos, neutrófilos, um basófilo e um promielócito. Observa-se uma célula sugestiva de blasto (A) e anisocitose eritrocitária. Fotografia obtida no CHUC durante o estágio.....	25
<b>Figura 19-</b> Cariograma do doente onde está demonstrada a t(9;22)(q34,q11). O cromossoma Ph está assinalado com a seta vermelha.....	25
<b>Figura 20-</b> Interpretação e procedimentos seguintes a adotar na avaliação de uroculturas. (TSA – Teste de Suscetibilidade aAntimicrobianos; GS – Gelose de Sangue) .....	33
<b>Figura 21-</b> Isolamento de Campylobacter jejuni no meio CAM. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio .....	34
<b>Figura 22-</b> Isolamento de Candida albicans no meio SGC. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio .....	39
<b>Figura 23-</b> Esfregaço de expetoração de um doente corado pela técnica de Ziehl-Neelsen, onde se observam bacilos álcool-ácido resistentes corados de vermelho pela fucsina (x1000).....	41
<b>Figura 24-</b> Fungo filamentosso sugestivo de Mucor sp. obtido pela técnica de cultura dilacerada (x40). Fotografia tirada no CHUC durante o estágio.....	43
<b>Figura 25-</b> Cinco testes negativos (sem aglutinação) de Rosa de Bengala. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio .....	44
<b>Figura 28-</b> Meio Hecktoen com crescimento de colónias pequenas, translúcidas e com centro negro sugestivas de Salmonella spp. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio ..	49
<b>Figura 29-</b> TSA manual para testar a suscetibilidades da bactéria em estudo a Ciprofloxacina. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio.....	50

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Parâmetros que compõem o eritrograma .....	5
<b>Tabela 2-</b> Condições que elevam/diminuem as populações leucocitárias <sup>9</sup> .....	10
<b>Tabela 3-</b> Parâmetros que compõem o trombograma .....	13
<b>Tabela 4-</b> Principais causas de trombocitopenia <sup>10</sup> .....	14
<b>Tabela 5-</b> Breve descrição individual de cada parâmetro <sup>18</sup> .....	22
<b>Tabela 6-</b> Hemograma .....	24
<b>Tabela 7-</b> Contagem celular realizada no esfregaço de sangue periférico do doente pelo patologista clínico.....	25
<b>Tabela 8-</b> Equipamentos, metodologias e principais doseamentos realizados no sub-setor de Autoimunidade.....	27
<b>Tabela 9-</b> Equipamentos, metodologias e principais doseamentos realizados no sub-setor de Imunologia/ Imunoalergologia .....	27
<b>Tabela 10-</b> Painéis de Suscetibilidade Antimicrobiana do MicroScan WalkAway .....	31
<b>Tabela 11-</b> Processamento de amostras de fezes .....	34
<b>Tabela 12-</b> Processamento de amostras de sangue de hemoculturas positivas .....	35
<b>Tabela 13-</b> Processamento de amostras de LCR.....	36
<b>Tabela 14-</b> Processamento de líquido pleural.....	37
<b>Tabela 15-</b> Processamento de líquido peritoneal e sinovial.....	37
<b>Tabela 16-</b> Tabela de Murray e Washington.....	38
<b>Tabela 17-</b> Processamento de expetorações e aspirados transtraqueais.....	38
<b>Tabela 18-</b> Processamento de lavados brônquicos e bronco-alveolares.....	38
<b>Tabela 19-</b> Processamento de exsudados vaginais, uretrais e retais .....	39
<b>Tabela 20-</b> Testes moleculares de identificação de micobactérias utilizados no laboratório de micobacteriologia do SPC-CHUC .....	42
<b>Tabela 21-</b> Painéis e respectivos exemplos de microrganismos/toxinas detetados no FilmArray® Torch.....	47
<b>Tabela 22-</b> Estudo analítico à admissão no serviço de urgências .....	48
<b>Tabela 23-</b> Parâmetros analisados no setor de Bioquímica .....	51

## ABREVIATURAS

AMA – Ac anti-mitocôndrias

ANA – Ac Antinucleares

ANCA – Ac Anti-Citoplasma de Granulócitos

Anti PF4 – Anti Fator Plaquetar 4

Anti-LMK I – Ac Anti-Microsomas Renais e Hepáticos

aPTT – Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

ASMA – Ac Anti-Músculo Liso

BAAR – Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

BHI – *Brain Heart Infusion*

CAM – Meio de *Campylobacter*

CBGN – Caldo de Bacilos de Gram Negativos

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CIN – Gelose *Yersinia*

CLIA – Quimioluminescência

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CM – *Cooked meat*

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

ENA – Ac Anti-antígenos Nucleares Extraíveis

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FEIA – Imunoensaio Fluoroenzimático

GS – Gelose de Sangue

HAE – Gelose chocolate seletiva para *Haemophilus* spp.

Hb – Concentração de Hemoglobina

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HCT – Hematócrito

HE – Gelose Hektoen

HG – Hospital Geral dos Covões

HP – Hospital Pediátrico

HUC – Hospital Universitário de Coimbra

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgG – Imunoglobulina G  
IgM – Imunoglobulina M  
INR – *International Normalized Ratio*  
ISI – Índice de Sensibilidade Internacional  
ITL – Inibidor Tipo Lúpus  
ITU – Infecções do Trato Urinário  
LCR – Líquido Cefalorraquidiano  
LES – Lupus Eritematoso Sistêmico  
LSS – Lauril Sulfato de Sódio  
MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Offflight*  
MBPL – Manual de Boas Práticas Laboratoriais  
MGIT – *Mycobacteria Growth Indicator Tube*  
MHE – gelose de Mueller Hinton  
MHF – gelose de Mueller Hinton com 5% de sangue de cavalo  
MPO – Ac Anti-Mieloperoxidase  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PR3 – Ac Anti-Proteinase 3  
PVX – Gelose de chocolate com Polyvitex  
RBC – Número de eritrócitos  
RDW – Coeficiente de Variação Eritrocitário  
SCT – Tempo de Coagulação com Sílica  
SGC – meio Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol  
SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SPC – Serviço de Patologia Clínica  
SS – Gelose *Salmonella-Shigella*  
TIH – Trombocitopenia Induzida por Heparina  
TP – Tempo de Protrombina  
TSA – Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos  
TT – Tempo de Trombina  
TVVRd – Teste de Veneno de Víbora de Russell diluído  
VCAT – Meio de *Neisseria gonorrhoeae*  
VCM – Volume Corpuscular Médio  
VPM – Volume Plaquetar Médio  
VS – Velocidade de Sedimenta

# I. INTRODUÇÃO

As análises clínicas são um importante meio complementar de diagnóstico clínico. Desempenham um papel crucial na prestação de cuidados de saúde, uma vez que ao compreenderem vários domínios científicos auxiliam na previsão, diagnóstico e monitorização de doenças.

O processo analítico baseia-se em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. Assim, qualquer erro cometido durante alguma destas fases influencia o resultado laboratorial e acarreta consequências para o doente.

Este relatório tem por objetivo descrever o percurso de aprendizagens adquiridas durante o meu estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC), no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Apresenta conhecimentos adquiridos durante o percurso académico e de estágio, bem como a sua aplicação na vertente prática, além das competências analíticas e interpretativas dos resultados laboratoriais adquiridas e consolidadas durante este estágio.

O SPC-CHUC é um centro hospital de referência nacional e internacional, e por isso é constituído por uma vasta gama de áreas, tecnologias e técnicas laboratoriais às quais tive oportunidade de assistir e participar, e assim consolidar conhecimentos anteriormente adquiridos com o apoio fundamental de técnicos e patologistas clínicos de todas as valências.

Neste relatório irei mencionar as valências de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia, sendo que irei abordar com maior detalhe Hematologia e Microbiologia.



## 2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SPC - CHUC), localizado no Edifício de São Jerónimo, é resultado da fusão dos Serviços de Patologia Clínicos de três hospitais: Hospital Universitário de Coimbra (HUC), Hospital Geral dos Covões (HG) e o Hospital Pediátrico (HP).

O SPC - CHUC é dirigido pelo Doutor Fernando Rodrigues e engloba uma vasta equipa multidisciplinar constituída por médicos patologistas clínicos, farmacêuticos, técnicos superiores de saúde, técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica, assistentes operacionais e assistentes administrativos.

O serviço está fisicamente dividido por sala de serviços administrativos, sala de lavagem de material, salas de colheitas, zona de receção de amostras, assim como pelos setores de Microbiologia, Hematologia, Imunologia e Bioquímica.

Diariamente é rececionado um elevado número de amostras, sendo a maioria das enfermarias e salas de colheitas do HUC, e as restantes do HG, HP, Hospital Sobral Cid, Maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos, como também de outras instituições públicas e privadas. Em virtude disto foi implementado um sistema automatizado do tipo *corelab*, que assenta no pressuposto de colher o menor número de tubos por doente e no menor tempo de resposta na apresentação dos resultados. Através deste sistema automatizado, as amostras são encaminhadas, de acordo com os parâmetros analíticos solicitados para análise, para os diferentes setores, com exceção das amostras para estudo microbiológico que não entram nesta rede automatizada, e que são entregues no próprio setor.

Para além do sistema automatizado do *corelab*, salienta-se o sistema informático Clinidata XXI (MaxData) que permite o acesso a informações clínicas, histórico dos pacientes, assim como dos pedidos efetuados em cada amostra. Assim, este sistema em rede oferece inúmeras vantagens entre as quais se destacam a rapidez e a facilidade em aceder às informações relativas ao estado de processamento das amostras, a comunicação direta dos pedidos aos autoanalisadores das diferentes áreas, assim como do envio direto dos resultados, evitando deste modo erros por parte da equipa técnica no registo dos mesmos.

### 3. CONTROLO DE QUALIDADE

A adoção de um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) é fundamental para garantir a máxima confiança e rigor dos resultados, assim como da qualidade dos serviços prestados. No SPC-CHUC existe um elemento responsável pelo controlo de qualidade, que garante que todos os procedimentos e atividades sejam regidos por protocolos pré-estabelecidos e baseados no Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL).

O Controlo de Qualidade Interno (CQI) avalia a precisão analítica a partir do doseamento de parâmetros de um conjunto de preparações comerciais de concentrações conhecidas. Estes controlos são realizados diariamente e são utilizados 2 ou 3 níveis de controlo. Após a passagem dos controlos, nos respetivos equipamentos, são geradas automaticamente cartas de *Levey Jennings*, cujos critérios de análise foram previamente estabelecidos com base nas regras de *Westgard*. As cartas geradas são posteriormente analisadas pelos responsáveis de cada setor, a fim de identificar alguma não conformidade e assegurar o rigor nos resultados dados pelo equipamento.

Além do CQI, o SPC-CHUC participa periodicamente em programas de Controlo de Qualidade Externo (CQE) que visam avaliar a exatidão analítica. Laboratórios de referência enviam amostras “cegas” para serem processadas como uma amostra normal e os resultados obtidos são posteriormente comparados com os de outros laboratórios que utilizam o mesmo equipamento e a mesma metodologia. A análise do relatório obtido é importante porque permite avaliar o método e/ ou equipamento, alertando para eventuais erros e necessidade de ações corretivas em prol da segurança e fiabilidade dos resultados obtidos. O SPS participa mensalmente em alguns programas de CQE, dos quais *External Quality Assurance Services (EQAS)*, *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UKNEQAS)*, *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)* e Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

## 4. HEMATOLOGIA

A hematologia é a ciência que se dedica ao estudo do sangue: o plasma e os elementos figurados, isto é, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. Estuda, também, a síntese e os órgãos onde são produzidos, os órgãos hematopoiéticos. Além de estudar o estado de normalidade dos elementos sanguíneos e dos órgãos hematopoiéticos, estuda as doenças relacionadas.

### 4.1 HEMOGRAMA

O hemograma corresponde ao conjunto de parâmetros que descrevem o número e algumas características dos elementos figurados do sangue e assume uma importância primordial numa avaliação fisiológica. Os parâmetros determinados são referentes à série vermelha (aos eritrócitos), série branca (aos leucócitos) e à série plaquetária (às plaquetas).

No setor da Hematologia analisam-se amostras de sangue total, aspirados de medula óssea e líquidos biológicos, como líquido sinovial, pleural, pericárdico ou peritoneal, contudo, as primeiras são as que representam o maior volume de trabalho.

As amostras de sangue são colhidas em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tripotássico (K3). Este anticoagulante mantém a integridade celular e inibe a cascata de coagulação, uma vez que quelata o cálcio e desta forma impede a agregação plaquetária<sup>1</sup>.

Depois da sua chegada ao *corelab* e conseqüente triagem, estas amostras são encaminhadas através de um sistema em rede automatizado para o Sysmex XN-9000<sup>TM</sup>. Este inclui quatro contadores hematológicos, três XN-10 e um XN-20. É também composto por um módulo que realiza e cora, pela coloração de May-Grunwald Giemsa, esfregaços de sangue periférico, o SP-10, e ainda um segundo módulo que digitaliza esses esfregaços, o DI-60, e os encaminha para o *software* Cellavision. Assim, através deste *software* é possível realizar conseqüentemente uma identificação presuntiva e um agrupamento das diferentes populações celulares. Além de diminuir a quantidade de lâminas que são revistas microscopicamente pelos patologistas, foram ainda criados critérios de revisão que têm como objetivo dar conformidade a resultados anômalos, verificando a sua autenticidade mediante uma série de regras de decisão pré-definidas pelo laboratório, indicando a realização de ações, como a preparação de uma nova lâmina para revisão microscópica e, caso necessário, contagem diferencial manual de leucócitos<sup>2</sup>.

#### 4.1.1 Série vermelha – Eritrograma

Os eritrócitos são os elementos figurados mais abundantes da corrente sanguínea e responsáveis pelo transporte do oxigênio dos pulmões para os tecidos. O processo de síntese destas “células”, designado de eritropoiese, é regulado principalmente pela eritropoietina. Ainda assim, outros elementos, como o ferro, o ácido fólico e a vitamina B12, são muito importantes neste processo<sup>3</sup>.

O eritrograma permite avaliar os eritrócitos tendo como base a determinação do número de eritrócitos (RBC), a concentração de hemoglobina (Hb) e o hematócrito (HCT). A partir destes três parâmetros são calculados os índices eritrocitários, isto é, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Também são determinados o número de reticulócitos e de eritroblastos. As determinações são efetuadas pelos autoanalisadores, XN-10 e XN-20, que utilizam diferentes metodologias e que estão descritas no Anexo I. A avaliação dos eritrócitos e das plaquetas, é feita no canal RBC/PLT, através da técnica de impedância com focagem hidrodinâmica<sup>4</sup>. Já para a medição da hemoglobina é usado um método colorimétrico, o método Lauril Sulfato de Sódio (LSS)<sup>5</sup>. Os reticulócitos são contabilizados no canal RET. A Tabela I apresenta os valores de referência dos parâmetros do eritrograma e indica o seu significado e interpretação.

**Tabela I** - Parâmetros que compõem o eritrograma

Parâmetro	Valores de referência	Interpretação
<b>RBC</b>	Homem: 4,5-5,9 x10 <sup>12</sup> /L Mulher: 3,9-5,2 x10 <sup>12</sup> /L	Número de eritrócitos por unidade de volume de sangue.
<b>Hb</b>	Homem: 13,0-17,5 g/dL Mulher: 12,0-15,6 g/dL	Quantidade de hemoglobina por unidade de volume de sangue.
<b>HCT</b>	Homem: 41,0-53,0% Mulher: 35,5-45,5%	Fração ocupada pelos eritrócitos no volume total de sangue.
<b>VCM</b>	80,0-100,0 fl	Volume médio dos eritrócitos. Permite caracterizar os eritrócitos como microcíticos, normocíticos ou macrocíticos.
<b>HCM</b>	26,0-34,0 pg	Quantidade de hemoglobina média existente em cada eritrócito.
<b>CHCM</b>	31,0-37,0 g/dL	Concentração média de hemoglobina por eritrócito. Permite caracterizar os eritrócitos como hipocrômicos, normocrômicos ou hiperocrômicos.
Coeficiente de Variação Eritrocitário ( <b>RDW</b> )	11,5-15,0%	Amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos, ou seja, representa o índice de anisocitose eritrocitário.
<b>Reticulócitos</b>	0,5-2,5%	Permite avaliar a eficácia da medula na produção dos eritrócitos.
<b>Eritroblastos</b>	-	Permite fazer diagnóstico e prognóstico de doenças hematológicas. Reflete stress na medula com libertação para o sangue periférico de formas eritrocitárias imaturas.

#### **4.1.1.1 Série vermelha – Alterações quantitativas**

Múltiplas patologias provocam alterações nos parâmetros do eritrograma, sendo de realçar as anemias. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as anemias definem-se como a redução da concentração de hemoglobina no sangue periférico, abaixo dos valores normais para a idade e o sexo (<13 g/dL nos homens e <12 g/dL nas mulheres), que pode ser acompanhada ou não pela diminuição do número de eritrócitos. Além destes dois parâmetros, alterações nos valores do VCM e CHCM fornecem indicações quanto a possíveis tipos de anemia. Assim, um VCM <80 fL e CHCM <31 g/dL permitem classificar a anemia como microcítica e hipocrômica e surgem em casos de anemias por déficit de ferro e sideroblásticas, talassémias e doenças crônicas severas<sup>6</sup>. Por outro lado, um VCM entre 80-100 fL e CHCM entre 31-37 g/dL classificam a anemia como normocítica e normocrômica, e surgem em casos de anemias hemolíticas e de doenças crônicas. Por último, um VCM >100 fL classifica a anemia como macrocítica, e surge em casos de anemia megaloblásticas (défice de vitamina B12 e ácido fólico), hepatopatias, alcoolismo, hipotireoidismo, drogas e falência medular<sup>3</sup>.

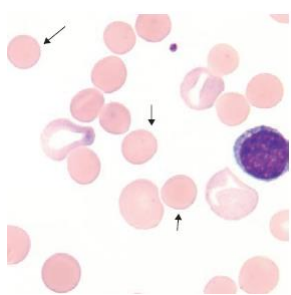
Na avaliação das anemias é fundamental ter conhecimento da capacidade hematopoiética da medula óssea, e uma forma simples de a avaliar é determinar o número de eritrócitos imaturos no sangue periférico. Assim a contagem de reticulócitos é um indicador indireto da atividade eritropoiética da medula e auxilia na distinção entre anemias regenerativas (percentagem de reticulócitos aumentada) e arregenerativas (percentagem de reticulócitos diminuída). Após uma hemorragia ou em casos de anemias hemolíticas, há um aumento de eritropoietina e, conseqüentemente da eritropoiese, que leva ao aumento dos reticulócitos que são libertados para o sangue periférico de forma compensatória. Por outro lado, condições que interferem na capacidade hematopoiética da medula óssea, nomeadamente deficiências nutricionais, hepatopatias (com redução na síntese de eritropoietina) ou quadros inflamatórios crônicos, levam à diminuição do número de reticulócitos<sup>3</sup>.

#### **4.1.1.2 Série vermelha – Alterações qualitativas**

O eritrograma fornece informações importantes para o diagnóstico de alterações ou patologias que envolvem os eritrócitos, porém, algumas alterações qualitativas não são detetáveis. Assim, torna-se importante a interpretação do esfregaço de sangue periférico.

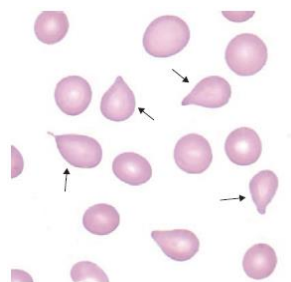
Na série vermelha, as células podem ser avaliadas quanto à variação de cor (anisocromia), tamanho (anisocitose) e forma (poiquilocitose). Para a avaliação da anisocromia deve-se ter em consideração os valores da CHCM, uma vez que, permitem classificar os

eritrócitos como hipocrômicos, normocrômicos ou hiperocrômicos. Quanto à avaliação da anisocitose deve-se considerar o RDW, assim como, o VCM, que permitem caracterizar os eritrócitos como microcíticos, normocíticos ou macrocíticos. Já na avaliação da poiquilocitose, as principais alterações morfológicas observadas são as descritas abaixo.



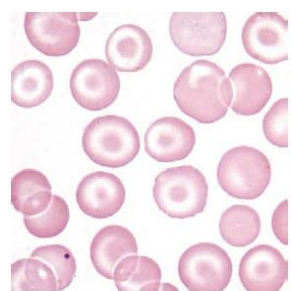
**Figura 1-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de esferócitos. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p.97

Esferócitos: são eritrócitos que adquiriram forma esférica devido à perda de porções de membrana celular, mas sem perda de citoplasma. Como consequência há um aumento de “tensão” na membrana, com aumento da fragilidade osmótica da célula. No esfregaço aparecem como células com diâmetro menor e de tonalidade mais escura, comparativamente aos eritrócitos normais. Estas células podem-se observar em esfregaços sanguíneos de pacientes com Esferocitose Hereditária, anemias hemolíticas, após transfusões sanguíneas e queimaduras severas<sup>7</sup>.



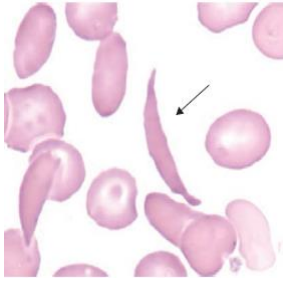
**Figura 2-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de dacriócitos. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p.103

Eritrócitos em lágrima/ Dacriócitos: eritrócitos em forma de gota ou em lágrima. Esta alteração surge devido a fibrose da medula óssea, assim como em algumas anemias hemolíticas e megaloblásticas<sup>7</sup>.



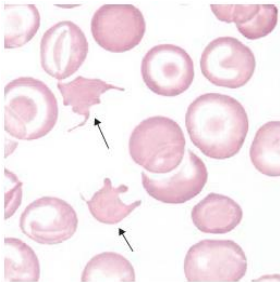
**Figura 3-** Esfregaço de sangue periférico onde se observam várias células em alvo. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 98

Células em alvo: são eritrócitos que apresentam uma distribuição anormal de hemoglobina que resulta na formação de uma mancha central intensa rodeada por uma área mais clara. Esta alteração resulta de alterações no conteúdo em lípidos (aumento de colesterol e de fosfolípidos). Estas células podem-se observar em esfregaços sanguíneos de pacientes com hemoglobinopatias, hepatopatias, após esplenectomia, talassémias e anemias ferropénicas<sup>7</sup>.



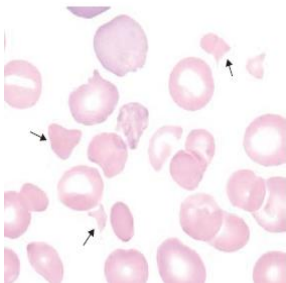
Drepanócitos: são eritrócitos alongados curvos ou em forma de S característicos da anemia falciforme<sup>7</sup>.

**Figura 4-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de drepanócitos. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 99



Acantócitos: são eritrócitos que apresentam múltiplas projeções espiculadas que variam em tamanho e distribuição. Estas protusões são resultado de alterações na composição lipídica da membrana celular. Estas células podem ser observadas em esfregaços de pacientes com hepatopatias, abetalipoproteinemia e pós-esplenectomia<sup>7</sup>.

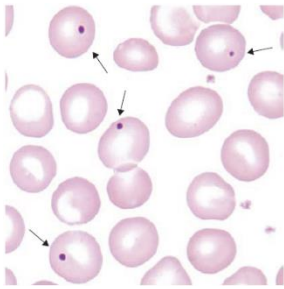
**Figura 5-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de acantócitos. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p.94



Esquizócitos: correspondem a fragmentos eritrocitários característicos de anemia hemolítica microangiopática, anemia megaloblástica, coagulação intravascular disseminada e queimaduras graves<sup>7</sup>.

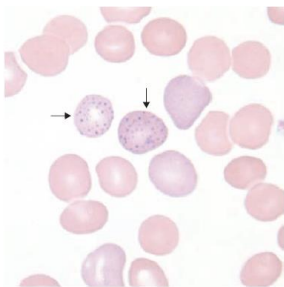
**Figura 6-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de esquizócitos. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 95

Além da poiquilocitose, a presença de inclusões citoplasmáticas constitui outra das alterações a ter em consideração na observação do esfregaço de sangue periférico. Estas inclusões surgem em diversas situações, pelo que a sua deteção deve ser reportada, uma vez que auxilia no diagnóstico. As inclusões eritrocitárias mais comuns são:



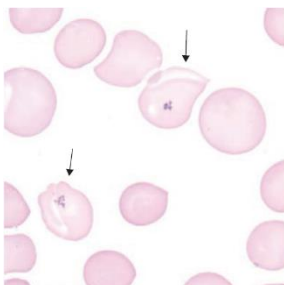
**Figura 7-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de Corpúsculos de *Howell-Jolly*. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 108

Corpúsculos de *Howell-Jolly*: correspondem a remanescentes de material nuclear presentes no interior dos eritrócitos. São pequenos, arredondados, basofílicos e normalmente únicos. Eles surgem após esplenectomia ou em situações de hipoesplenismo, por exemplo, nas doenças falciformes<sup>7</sup>.



**Figura 8-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença do pontilhado basófilo. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 109

Pontilhado basófilo: consiste em pequenas e múltiplas inclusões que contém RNA dispersas por todo o eritrócito. Pode ser observado em esfregaços de pacientes com anemias hemolíticas e megaloblásticas, hemoglobinopatias, talassemias, envenenamento por chumbo e mielofibrose<sup>7</sup>.



**Figura 9-** Esfregaço de sangue periférico onde se realça a presença de Corpúsculos de *Pappenheimer*. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 110

Corpúsculos de *Pappenheimer*: correspondem a inclusões basofílicas, pequenas, compostas de hemossiderina e normalmente presentes na periferia da célula. Estão associados com anemia sideroblástica e hipoesplenismo<sup>7</sup>.

#### 4.1.2 Série branca – Leucograma

O leucograma corresponde à parte do hemograma que avalia a série branca, os leucócitos. Estas células desempenham um importante papel de defesa do organismo e podem ser agrupadas em dois grupos: polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos).



Os leucócitos são contabilizados em equipamentos automatizados, em dois canais diferentes. O canal WDF (contagem diferencial) permite a distinção entre neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, já o canal WNR permite a diferenciação dos basófilos relativamente aos restantes leucócitos, como também dos eritroblastos. Os canais e respetivas metodologias estão descritos no Anexo 2. Além disto, os equipamentos apresentam sistemas de alerta que são acionados sempre que são detetados percursos celulares e alterações morfológicas e/ou quantitativas. Assim, através do canal WDF é ainda possível determinar-se a presença de granulócitos imaturos e de linfócitos atípicos (células linfocíticas de elevada fluorescência). Caso sejam detetados é emitido um alerta (“flag”), isto é, surgem mensagens e asteriscos associados aos parâmetros alterados e o procedimento seguinte, para confirmação dos resultados, é a realização de esfregaço sanguíneo<sup>8</sup>.

#### 4.1.2.1 Série branca – Alterações quantitativas

O leucograma fornece valores absolutos e percentuais da contagem total e diferencial de leucócitos. Esta contagem pode ser afetada por múltiplos fatores, como a idade, género, gravidez, stress, tabagismo e patologias de base. Deste modo, é importante avaliar as alterações quantitativas a fim de, juntamente com outros parâmetros analíticos, entender as possíveis causas subjacentes a estas alterações.

O intervalo de referência para o número total de leucócitos é  $4,0-11,0 \times 10^9/L$ . Assim, a leucocitose e a leucopenia são definidas como condições nas quais o número de leucócitos se encontra acima ou abaixo, respetivamente, do normal de referência, e algumas das condições associadas a cada uma destas alterações, para cada população leucocitária, encontram-se descritas na Tabela 2.

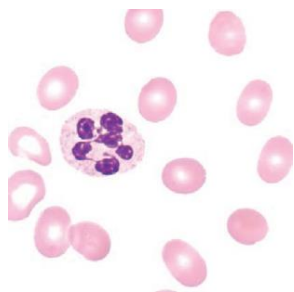
**Tabela 2-** Condições que elevam/diminuem as populações leucocitárias<sup>9</sup>

Leucócitos	Valores de referência $\times 10^9/L$	Condições associadas	
		Aumento	Diminuição
<b>Neutrófilos</b>	2,5-7,5	Infeções bacterianas, inflamação crónica, tabagismo, stress, exercício físico excessivo, distúrbios mieloproliferativos e neoplasias.	Alguns fármacos, sepsis, deficiências nutricionais, doenças hematológicas e autoimunes e distúrbios congénitos.
<b>Linfócitos</b>	1,5-3,5	Infeções virais e bacterianas, distúrbios endócrinos e leucemia aguda ou crónica.	HIV, imunossuppressores (esteroides e álcool), falência da medula óssea, stress e quimioterapia.
<b>Monócitos</b>	0,2-0,8	Infeções virais e fúngicas, doenças autoimunes, como lúpus e artrite reumatóide.	Terapia com glucocorticoides, anemia aplásica, leucemia (leucemia das <i>hairy cells</i> ), quimioterapia e stress.

<b>Eosinófilos</b>	0,04-0,4	Infeções parasitárias, alergias, alterações dermatológicas e neoplasias.	Terapia com glucocorticoides, HIV e stress.
<b>Basófilos</b>	0,01-0,1	Condições alérgicas, leucemias e doenças inflamatórias crônicas.	Gravidez e stress.

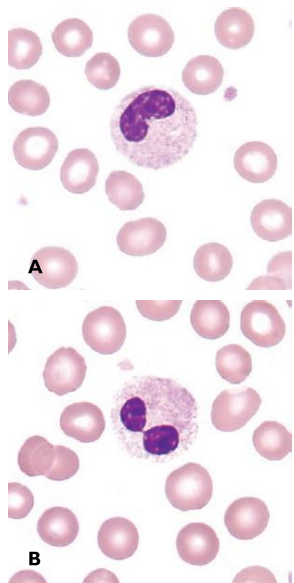
#### 4.1.2.2 Série branca – Alterações qualitativas

A avaliação e interpretação do esfregaço de sangue periférico, como a contagem diferencial de leucócitos por microscopia, são realizadas em casos específicos, nos quais os equipamentos automatizados não foram capazes de identificar e distinguir as diferentes populações celulares. Assim, os patologistas clínicos fazem as identificações microscopicamente a fim de evitar a emissão de resultados errôneos. Algumas das alterações que podem ser observadas são:



Neutrófilos hipersegmentados: neutrófilos que apresentam seis ou mais lóbulos. Esta alteração está presente nas anemias megaloblásticas, infecções crônicas e síndromes mielodisplásicas<sup>7</sup>.

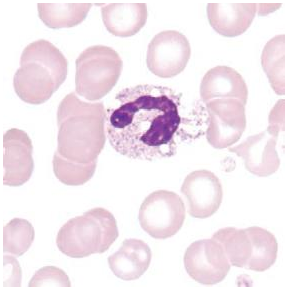
**Figura 10** - Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo hipersegmentado. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 133



Neutrófilos hiposegmentados: neutrófilos com núcleo em forma de amendoim, bilobado ou não segmentado, mas com cromatina de célula madura. Esta alteração está, normalmente associada com a síndrome de *Pelger-Huet* ou pseudo síndrome de *Pelger-Huet*.

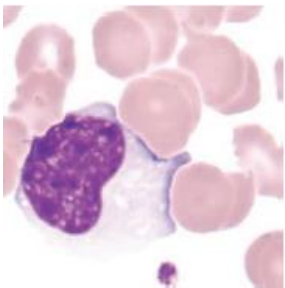
A síndrome de *Pelger-Huet* é uma anomalia herdada autossomicamente e afeta a maioria dos granulócitos (principalmente os neutrófilos). Já a pseudo síndrome de *Pelger-Huet* é uma anomalia adquirida que afeta menos de 50% dos granulócitos. É normalmente acompanhada por outras alterações morfológicas de malignidade, como se observa nos distúrbios mieloproliferativos e mielodisplásicos<sup>7</sup>.

**Figura 11**- Esfregaços de sangue periférico onde se observam neutrófilos hiposegmentados. A: núcleo em forma de amendoim. B: núcleo bilobado. Fonte: *Clinical hematology atlas*, p. 132



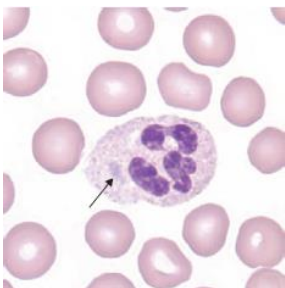
**Figura 12-** Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo vacuolizado. Fonte: Clinical hematology atlas, p. 134

Neutrófilos com vacúolos: podem aparecer um a vários vacúolos. Está associado a infecções bacterianas ou fúngicas, envenenamentos, quimioterapia ou artefactos. Os vacúolos contêm raramente microrganismos ou pigmentos, e estão, em condições normais, presentes nos monócitos (não são sugestivos de infecção)<sup>7</sup>.



**Figura 13-** Esfregaço de sangue periférico onde se observa um linfócito reativo. Fonte: Clinical hematology atlas, p. 138

Linfócito reativo: célula pleomórfica com núcleo irregular, cromatina grosseira ou fina, citoplasma abundante com intensa basofilia, presença de grânulos azurofílicos e com dimensões superiores aos linfócitos normais. Esta célula surge após estimulação antigénica, como por exemplo nas vacinações ou em infecções virais<sup>7</sup>.



**Figura 14-** Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo com um Corpo de Döhle. Fonte: Clinical hematology atlas, p. 135

Corpo de Döhle: inclusão citoplasmática de RNA ribossomal de cor azul acinzentada e forma variada. Está presente em múltiplas situações, incluindo em infecções bacterianas, sepsis e gravidez. Pode também surgir em células com granulações tóxicas<sup>7</sup>.



**Figura 15-** Esfregaço de sangue periférico onde se observa um neutrófilo com granulação tóxica. Fonte: Clinical hematology atlas, p. 136

Granulações tóxicas: grânulos primários dispersos pelo citoplasma de tonalidade roxo-escuro. Estão associadas a múltiplas situações incluindo infecções bacterianas, sepsis e após administração do fator de estimulação colonial de granulócitos<sup>7</sup>.

### 4.1.3 Série plaquetar – Trombograma

O trombograma corresponde à parte do hemograma que avalia a série plaquetar, as plaquetas. As plaquetas correspondem a fragmentos celulares dos megacariócitos pelo que são anucleadas e incapazes de realizar divisão celular. No entanto, estas assumem um importante papel na hemóstase, destacando-se na hemóstase primária.

No setor de hematologia do SPC-CHUC, as plaquetas são contabilizadas pelo método de impedância com focagem hidrodinâmica, explicado no Anexo 1. Além deste método, o contador hematológico XN-20 permite ainda a sua contabilização por fluorescência, tanto das plaquetas maduras quanto das imaturas. Esta metodologia, descrita no Anexo 3, é usada principalmente para confirmar valores baixos de plaquetas, por exemplo em casos de trombocitopenia devido à destruição periférica, perda de sangue ou devido a quimioterapia, uma vez que possui maior sensibilidade<sup>2</sup>.

O trombograma permite assim avaliar as características das plaquetas tendo por base a determinação do número de plaquetas, o volume plaquetar médio (VPM), o plaquetócrito e o coeficiente de variação plaquetar. A Tabela 3 apresenta os valores de referência dos parâmetros do trombograma e indica o seu significado.

**Tabela 3-** Parâmetros que compõem o trombograma

Parâmetros	Valores de referência	Significado
<b>Número de plaquetas</b>	150,0-450,0 $\times 10^9/L$	Número de plaquetas por unidade de volume de sangue.
<b>VPM</b>	8,5-12,0 fL	Volume médio das plaquetas.
<b>Plaquetócrito</b>	0,20-0,45%	Fração ocupada pelas plaquetas no volume total de sangue.
<b>Coeficiente de Variação Plaquetar</b>	9,0-17,0	Amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas.

#### 4.1.3.1 Série plaquetar – Alterações quantitativas

No sentido de manter a hemóstase, o intervalo de referência para o número total de plaquetas no sangue periférico é 150,0-450,0  $\times 10^9/L$ . Posto isto, alguns fatores como a gravidez, infeções virais, como por exemplo por Epstein-Barr ou doenças autoimunes, como a púrpura trombocitopénica idiopática, provocam alterações neste valor comprometendo o processo hemostático. É necessário que exista um equilíbrio constante entre a síntese e o consumo plaquetário, uma vez que um desequilíbrio nestes processos desencadeia eventos hemorrágicos ou trombóticos.

A trombocitose corresponde a uma condição na qual o número de plaquetas se encontra acima do intervalo de referência, e poderá estar associada a episódios trombóticos.

Por outro lado, a trombocitopenia corresponde à diminuição do número total de plaquetas. As trombocitopenias devem ser avaliadas e monitorizadas, uma vez que há associação com clínica hemorrágica e cuja gravidade aumenta com a diminuição do número de plaquetas. No entanto, uma baixa contagem não indica uma etiologia específica, pode estar associada a uma variedade de situações subjacentes. Assim é essencial investigar a verdadeira causa, de modo a tratar corretamente os doentes. Existem três causas principais para as trombocitopenias que são a diminuição da produção, o aumento da destruição e alteração na distribuição das plaquetas, que estão descritas na Tabela 4.

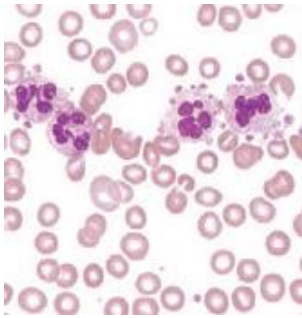
**Tabela 4-** Principais causas de trombocitopenia<sup>10</sup>

<b>Trombocitopenia</b>	<b>Descrição</b>
<b>Diminuição da produção</b>	Alterações na capacidade de síntese da medula óssea que se traduzem em trombocitopoiese ineficaz, diminuição na síntese de precursores megacariocíticos e regulação anormal da trombocitopoiese. Esta condição observa-se em casos de anemia megaloblástica, leucemia e anemia aplásica.
<b>Aumento da destruição</b>	Pode ter origem imunológica, como na Púrpura Trombocitopénica Imune, trombocitopenia neonatal e induzida por fármacos, como por heparina. Por outro lado, também pode ter origem não imunológica, como na Coagulação Intravascular Disseminada, Microangiopatias Trombóticas, Síndrome Hemolítico Urémico e Púrpura Trombocitopénica Trombótica.
<b>Alteração na distribuição</b>	Comum em indivíduos com doença hepática crónica com hipertensão portal e cirrose, associada a esplenomegalia. Como resultado do aumento do volume do baço verifica-se um aumento do sequestro plaquetário e, por isso, uma diminuição das plaquetas circulantes. Outro mecanismo associado à doença hepática é a diminuição da síntese plaquetar medular, como consequência da menor produção de trombopoietina a nível hepático.

#### **4.1.3.2 Série plaquetar – Alterações qualitativas**

A introdução de equipamentos automatizados facilitou o trabalho laboratorial, no entanto, a observação de esfregaços de sangue periférico por patologistas continua um procedimento de extrema importância no diagnóstico, nomeadamente de trombocitopenias. Por vezes são detetadas acidentalmente em análises de rotina, sem sintomatologia e/ou sinais clínicos sugestivos ou histórico de trombocitopenia. Nestas situações é importante realizar-se um novo esfregaço para exclusão de uma possível “pseudotrombocitopenia”, isto é uma falsa trombocitopenia, que na maioria dos casos resulta de agregação ou satelismo plaquetar.

A agregação plaquetar pode resultar de uma estimulação plaquetar durante uma punção venosa ou pode ser mediada por imunoglobulinas. A agregação resultante do fenómeno *in vitro*, particularmente em amostras de sangue colhidas em tubos com o anticoagulante EDTA, é mediado por um anticorpo a frio com especificidade para a glicoproteína IIb/IIIa plaquetar<sup>11</sup>.

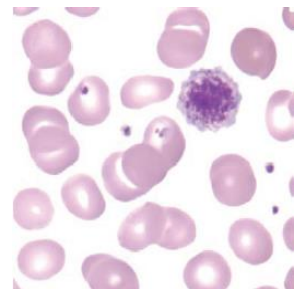


**Figura 16-** Esfregaço de sangue periférico onde se observa o fenómeno de Satelismo plaquetar. Fonte: Clinical hematology atlas, p. 214

O satelismo plaquetar é um fenómeno *in vitro* que se observa principalmente em amostras de sangue colhidas em tubos com o anticoagulante EDTA. Este fenómeno é induzido por um fator plasmático, normalmente por uma imunoglobulina G (IgG) ou imunoglobulina M (IgM), que se liga ao CD16 (receptor transmembranar) expresso à superfície dos neutrófilos e, assim, as plaquetas aderem e cercam os neutrófilos<sup>11</sup>.

Ambos os fenómenos mencionados em cima, não parecem ter qualquer significado clínico, no entanto diminuem falsamente o número de plaquetas. Neste sentido, deve proceder-se a uma nova colheita de sangue, em tubos com um anticoagulante diferente, habitualmente o citrato. Outro procedimento inclui uma nova contagem plaquetária após aquecimento da amostra, a uma temperatura de 37 °C durante 30 minutos, para dissociar possíveis agregados plaquetares.

A presença de plaquetas gigantes é outra alteração que pode ser observada no esfregaço de sangue periférico. Quando o turnover plaquetário aumenta, as plaquetas são normalmente maiores, adquirindo dimensões semelhantes a eritrócitos ou linfócitos. Assim, a ausência de plaquetas gigantes em pacientes com trombocitopenia é um dado importante no diagnóstico porque sugere um defeito na síntese plaquetária<sup>11</sup>.



**Figura 17-** Esfregaço de sangue periférico onde se observa uma plaqueta gigante. Fonte: Clinical hematology atlas, p. 178

## 4.2 VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação (VS) corresponde à distância medida em milímetros que os eritrócitos percorrem num tubo vertical durante um intervalo de tempo. A membrana citoplasmática eritrocitária possui carga negativa devido à presença de ácido siálico, que por sua vez cria um potencial de repulsão entre os eritrócitos denominado de potencial zeta. Este potencial de repulsão impede que os eritrócitos se empilhem e sedimentem rapidamente, e desta forma, os valores da VS, para indivíduos saudáveis, são baixos na primeira hora de sedimentação. Por outro lado, quando há um aumento na concentração plasmática de fibrinogénio, imunoglobulinas ou outras proteínas de fase aguda, a VS aumenta, uma vez que estas moléculas alteram a viscosidade plasmática<sup>2</sup>.

Existem várias condições que provocam o aumento da VS, sendo as mais frequentes a hemodiluição (como em anemias agudas ou crônicas, sem alteração morfológica), o aumento de proteínas de fase aguda (como na doença reumatóide), a presença de proteínas plasmáticas anormais (como no mieloma múltiplo), o aumento da concentração de imunoglobulinas (como em processos infecciosos ou inflamatórios) e as neoplasias<sup>2</sup>. Assim, mesmo sendo um parâmetro inespecífico, a VS constitui um importante marcador de inflamação e por isso é usado como *screening* e na documentação de processos inflamatórios.

No SPC-CHUC a determinação da VS é feita no aparelho automatizado VES-MATIC Cube 30, que se baseia no método de Westergren. Após uma agitação suave das amostras de sangue total colhidas em tubos com o anticoagulante EDTA, os tubos são colocados no aparelho. E, ao fim de 33 minutos, os resultados são elaborados e automaticamente impressos. Esta determinação é efetuada sem consumo de amostra, utilização de reagentes ou produção de resíduos.

### 4.3 HEMOSTASE

A hemostase é um mecanismo fisiológico que preserva a integridade do fluxo e limita a perda sanguínea após uma lesão. Os componentes do sistema hemostático têm de funcionar de forma regulada de modo evitar uma perda excessiva de sangue ou que se formem trombos intravasculares, decorrentes da formação excessiva de fibrina.

Foram apresentados vários modelos para explicar o processo hemostático, destacando-se, o modelo proposto por Macfarland e David & Ratnoff, em 1964, no qual foi proposta a hipótese da "cascata" para explicar a fisiologia do processo de coagulação sanguíneo. Este modelo é ainda atualmente aceite, como modelo explicativo, embora se saiba que a separação entre via intrínseca e extrínseca não ocorra *in vivo*.

O mecanismo hemostático subdivide-se em hemostase primária, secundária e terciária.

A hemóstase primária inicia-se imediatamente após a lesão vascular, com consequente vasoconstricção. Com diminuição do lúmen do vaso há diminuição do fluxo, ligação das plaquetas com o fator de von Willebrand (vWF) e aumento do contacto entre as plaquetas circulantes com o endotélio lesado. A exposição ao colagénio inicia a ativação plaquetária, com alteração da sua conformação e libertação do seu conteúdo, com consequente formação do tampão plaquetar<sup>12</sup>.

A hemostase secundária, também designada de coagulação, corresponde a uma cascata enzimática, na qual os seus componentes são ativados sequencialmente, e cujo produto final é a formação de um coágulo de fibrina estável. O modelo em cascata divide a coagulação numa via extrínseca, intrínseca e comum. Na via intrínseca, ocorre ativação por contacto do fator

XII, que por sua vez leva à ativação dos fatores XI e IX (na presença do seu cofator, o fator VIII), e na via extrínseca, há ativação do fator VII, na presença do seu cofator, o fator tecidual ou tromboplastina. Estas vias convergem na via comum, onde o complexo protrombinase (fator X e V,  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos) convertem a protrombina em trombina, que consequentemente converte o fibrinogênio em fibrina. Por fim, há ação do fator XIII que estabiliza o coágulo<sup>12</sup>.

A hemóstase terciária ou fibrinólise corresponde à degradação enzimática do coágulo, de modo a restabelecer a integridade e função do vaso lesado.

Na fase pré-analítica e analítica dos estudos da coagulação é importante ter em conta:

- Utilização de tubos com o anticoagulante citrato de sódio a 3,2% e respeitar a proporção 1:9 (anticoagulante para sangue)
- Realização dos testes até 4 horas após a colheita
- Realizar dupla centrifugação nos testes de coagulação especial de modo a obter-se plasma pobre em plaquetas
- Não processar amostras com volume incorreto, presença de coágulos, plasma hemolisado ou lipémico
- Reajustar a proporção de anticoagulante para sangue em indivíduos com um hematócrito superior a 55%.

Após averiguar se as amostras cumprem os critérios mencionados acima, estas são centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação, as amostras são introduzidas em suportes que as encaminha para o analisador ACL TOP® 700. Neste analisador são determinados os parâmetros hemostáticos recorrendo a três metodologias diferentes, sendo elas a coagulométrica, cromogénica e imunológica.

#### **4.2.1 Método Coagulométrico**

Neste método mede-se o intervalo em segundos de formação do coágulo após a adição de cloreto de cálcio à amostra através da técnica de turbidimetria. A partir deste método são determinados os seguintes parâmetros: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), fibrinogênio, tempo de trombina (TT), tempo de reptilase (TR), fatores de coagulação e inibidor tipo lúpus (ITL).



### Tempo de Protrombina (TP)

O TP é o teste mais solicitado pelos clínicos para avaliação do processo hemostático. Este permite avaliar a eficiência da via extrínseca, assim como da via comum. Posto isto permite a deteção, caso existam, de deficiências dos fatores II, V, VII, X e de fibrinogénio.

O TP consiste no intervalo, em segundos, em que um plasma citratado coagula após adição de tromboplastina, iões de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos à amostra de plasma do paciente.

Atualmente existem múltiplas preparações diferentes de tromboplastina, o que traz implicações nos resultados do TP mesmo quando é usada a mesma amostra. De forma a reduzir esta variabilidade, a Organização Mundial de Saúde (OMS) introduziu o *International Normalized Ratio* (INR) que representa a relação entre o TP do paciente e o valor padrão de TP (obtido através de um reagente de tromboplastina de referência internacional). O valor normal de INR varia entre 0,9 e 1,7 e calcula-se através da seguinte equação:

$$INR = (TP \text{ do paciente} / TP \text{ referência})^{ISI}$$

ISI= Índice de Sensibilidade Internacional. É determinado pelo fabricante de tromboplastina e o seu valor varia entre 1,0 e 1,4.

O intervalo de valores de referência do TP varia entre 9,4 e 12,55 segundos, no entanto, o TP pode estar alterado devido ao défice de fatores que constituem a via extrínseca e/ou comum, patologias hepáticas, défice de vitamina K, presença de inibidores ou anticoagulantes orais dependentes de vitamina K<sup>13</sup>.

### Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT)

O aPTT corresponde ao intervalo, em segundos, que um plasma citratado coagula na presença de fosfolípidos e de um ativador de superfície, como a sílica e a cefalina bovina.

Este teste é utilizado para avaliar a eficiência da via intrínseca e da via comum, assim como é muito útil na monitorização de terapias anticoagulantes com heparina.

O intervalo de valores de referência do aPTT varia entre 23,4 e 35,45 segundos, contudo, o aPTT pode estar alterado devido a deficiências congénitas de fatores que compõem a via intrínseca e/ou comum, como é o caso do défice do fator VIII na Hemofilia A. De igual modo pode estar alterado devido a hepatopatias, presença de inibidores, como o inibidor tipo lúpus, ou de anticoagulantes orais diretos, como o Debigatrano<sup>13</sup>.

### Fibrinogénio

O fibrinogénio, ou fator I da coagulação, é uma glicoproteína sintetizada nos hepatócitos que circula na corrente sanguínea numa concentração de 150 a 400 mg/dL.

O método de quantificação usado é o de Clauss, que se baseia na adição em excesso de trombina e desta forma a sua conversão em fibrina depende apenas da concentração de fibrinogénio presente na amostra do doente. Assim, segundo a Associação Portuguesa de Hemofilia e de outras Coagulopatias Congénitas, o valor obtido permite o diagnóstico de anomalias quantitativas, como a afibrinogénemia (ausência completa de fibrinogénio) e hipofibrinogénemia, como também de anomalias qualitativas como a disfibrinogénemia que se caracteriza por um anormal funcionamento do fibrinogénio. Estes valores devem ser avaliados conjuntamente com os tempos de trombina e de reptilase.

#### Tempo de Trombina (TT)

O TT corresponde ao intervalo, em segundos, de conversão do fibrinogénio em fibrina após adição de trombina bovina. O intervalo de referência do TT varia entre 15 e 18 segundos, no entanto, este está aumentando na presença de heparina, de elevadas concentrações de produtos resultantes da fibrinólise, de baixas concentrações ou anormal funcionamento do fibrinogénio<sup>14</sup>.

#### Tempo de Reptilase (TR)

Para determinação do TR é utilizada uma enzima proteolítica, a batroxobina, isolada do veneno da serpente *Bothrops atrox*, com atividade semelhante à da trombina. Assim, o TR corresponde ao intervalo, em segundos, de conversão do fibrinogénio em fibrina após a adição de batroxobina. O seu intervalo de referência varia entre 18 e 22 segundos.

O valor do TR é sobretudo afetado por alterações na conversão do fibrinogénio em fibrina, normalmente associadas a anomalias quantitativas ou qualitativas de fibrinogénio e/ ou devido à presença de produtos resultantes da fibrinólise.

Este teste é normalmente solicitado em doentes com alterações de novo nos seus testes de rotina de coagulação, assim como, e graças à sua insensibilidade aos inibidores de trombina, permite excluir contaminações por heparina, uma vez que o resultado não é afetado<sup>15</sup>.

#### Fatores de Coagulação

O doseamento individual dos fatores II, V, VII, VIII, IX, X, XI e XII permite confirmar o défice do fator, assim como associar possíveis patologias associadas a esse défice. Por exemplo, o défice do fator VIII pode ser associado a Hemofilia A.

Para estes doseamentos, realiza-se uma mistura entre um plasma deficitário no fator em estudo e o plasma do doente. Assim, a concentração do fator em estudo na mistura (que

corresponde à presente no plasma do doente) é proporcional à correção do tempo de coagulação prolongado. De forma a distinguir entre deficiência de fator e presença de inibidor de fator podem ser realizados dois tipos de teste paralelamente:

- **Teste de Mistura**

O teste de mistura tem como objetivo detetar a ausência de um fator ou a presença de um inibidor de fator. Para tal realiza-se uma mistura de plasma do doente com um plasma de controlo. Após incubação a 37° C por 20 minutos, determina-se novamente o aPTT e o Índice de Rosner.

$$\text{Índice de Rosner} = \frac{aPTT \text{ mistura} - aPTT \text{ controlo}}{aPTT \text{ doente}} \times 100\%$$

Se o valor for inferior a 12% significa que há défice de um fator, mas se for superior a 15% significa que há presença de um inibidor de fator. Quando o valor se encontra entre 12 e 15% é duvidoso pelo que há necessidade de realizar mais testes.

- **Teste de paralelismo**

No teste de paralelismo são realizadas diluições sucessivas do plasma do doente e, caso se identifique um défice de fator, à medida que o número de diluições aumenta, a quantificação de fator é cada vez menor. Contrariamente, caso exista um inibidor à medida que a amostra é diluída, a quantificação de fator aumenta uma vez que a quantidade de inibidor presente é cada vez menor.

### Inibidor Tipo Lúpus (ITL)

O ITL ou comumente designado como anticoagulante lúpico, corresponde a um anticorpo direcionado contra os fosfolípidos presentes na membrana celular. Pode-se suspeitar da sua presença quando se verifica um prolongamento do aPTT sem causa conhecida<sup>14</sup>.

Para a deteção do ITL são realizados dois testes: o teste de veneno de víbora de Russell diluído (TVVRd) e o tempo de coagulação com sílica (SCT). Ambos envolvem um teste de *screening* com baixa concentração de fosfolípidos e um teste confirmatório com alta concentração de fosfolípidos (que neutralizam o ITL). Com base nos valores dos tempos de coagulação obtidos é calculado um rácio para o TVVRd e para o SCT e, basta um dos resultados ser superior a 1,2 para indicar a presença do anticoagulante lúpico. Este tem

significado clínico quando, após 12 semanas, se mantém positivo, estando assim associado a risco trombótico.

O ITL é comumente doseado em indivíduos com patologias autoimunes, como Lupus Eritematoso Sistémico (LES) e Síndrome Antifosfolípídico, assim como em contexto pré-operatório<sup>14</sup>.

#### **4.3.2 Método Imuno-turbidimétrico**

Este método baseia-se na alteração da turbidimetria de uma suspensão com micropartículas de látex revestidas com um anticorpo monoclonal específico medida por fotometria. Caso se verifique ligação entre o antígeno em estudo e o anticorpo, ligado covalentemente às micropartículas, então deteta-se aglutinação. Desta ligação gera-se um aumento da turbidimetria da mistura e este aumento reflete-se no aumento da absorvância da mistura.

#### D-dímeros

Os D-dímeros correspondem a moléculas resultantes da degradação do coágulo de fibrina por ação da plasmina. Estas moléculas apresentam um valor preditivo negativo, ou seja, no caso de um valor baixo (inferior a 500 mg/dL) excluem o fenómeno de tromboembolia pulmonar. Por outro lado, podem estar elevados em estados inflamatórios, idade avançada, na gravidez ou infeção por SARS-CoV-2.

#### Anti Fator Plaquetar 4 (anti PF4)

A avaliação do Anti Fator Plaquetar 4 (Anti PF4) permite distinguir a presença de um tipo específico de trombocitopenia, a trombocitopenia induzida por heparina (TIH). Na TIH ocorre ativação e agregação plaquetar mediada por anticorpos IgG que reconhecem os complexos formados pelo fator plaquetar 4 com a heparina. Daqui resulta um aumento do consumo de plaquetas num período de 5 a 10 dias após o início da toma do anticoagulante<sup>16</sup>.

Como os casos de TIH representam uma percentagem reduzida da população à qual é administrada heparina, a sua avaliação não é feita por rotina. Assim, num primeiro passo realiza-se um teste de *screening* por *lateral flow assay* STic Expert HIT (Stago) e no caso deste ser positivo, parte-se para o segundo passo que é o doseamento dos anticorpos.

### 4.3.3 Método Cromogénico

Este método permite detetar um produto corado que resultou da ação enzimática do analito de interesse sobre um substrato cromogéneo específico. A absorvância do produto é medida a 405 nm e é inversamente proporcional à quantidade do analito.

#### Fator Anti-Xa

O doseamento do fator anti-Xa foi introduzido para monitorizar e ajustar terapêuticas com heparina não fracionada ou de baixo peso molecular. Neste teste, ao plasma do paciente é adicionado um reagente que contém excesso de fator Xa, que é inibido pela heparina. Assim pela determinação da quantidade residual de fator Xa que não se ligou à heparina é possível estimar os níveis de heparina não fracionada ou de baixo peso molecular. A cor do produto formado é inversamente proporcional aos níveis estimados de heparina<sup>17</sup>.

### 4.3.4 Tromboelastograma

O tromboelastograma é um teste viscoelástico realizado no aparelho ROTEM® (Sigma) que mimetiza o processo de coagulação *in vivo*, isto é, permite avaliar a formação, estabilização e degradação do coágulo em tempo real<sup>18</sup>.

Para este teste são utilizadas amostras de sangue total colhidas em tubos de citrato de sódio, mas que não são sujeitas a um processo de centrifugação e são avaliados 5 parâmetros em simultâneo: INTEM, EXTEM, FIBTEM, HEPTTEM e APTEM. A Tabela 5 apresenta uma breve descrição de cada parâmetro avaliado no tromboelastograma.

**Tabela 5-** Breve descrição individual de cada parâmetro<sup>18</sup>

INTEM	Analisa a via intrínseca e a comum, sendo o seu valor sensibilizado pela presença de heparina na amostra.
EXTEM	Avalia a via extrínseca e a comum.
FIBTEM	Avalia a contribuição do fibrinogénio na formação do coágulo.
HEPTTEM	Indica a presença de heparina na amostra e deve ser analisado conjuntamente com o INTEM.
APTEM	Permite detetar a presença de hiperfibrinólise e deve ser analisado conjuntamente com o EXTEM.

Este teste é especialmente solicitado em situações de hemorragias maciças agudas, transplantações em idade pediátrica e ainda em pacientes com COVID-19.

## 4.4 CITOGÉNÉTICA

A citogenética é um ramo da genética que se dedica ao estudo dos cromossomas e por isso permite a identificação de alterações numéricas e/ou estruturais nos mesmos. No

SPC-CHUC, a citogenética convencional é direcionada para o diagnóstico de patologias hemato-oncológicas, como as leucemias e as síndromes mieloproliferativas, mas também assume um importante papel no prognóstico e na monitorização do seu tratamento.

O cariótipo humano é constituído por 23 pares de cromossomas. Estes são classificados tendo como base o seu tamanho, padrão de bandas e posição do centrómero, e são representados num cariógrama.

As amostras normalmente utilizadas são aspirados de medula óssea, colhidos em tubos heparina-lítio, no entanto também podem ser amostras de sangue total, para depois se realizarem culturas celulares no meio MarrowMAX™ (ThermoFisher Scientific). Para cada amostra são realizadas duas culturas, em que num frasco de cultura é adicionado metotrexato e no outro, timidina ET. O metotrexato e a timidina ET são agentes antineoplásicos utilizados para sincronizar as culturas por bloqueio do ciclo celular em interfase. As amostras ficam a incubar a 37° C por 24h e, após este período é adicionado KaryoMAX™ Colcemid™, um agente antineoplásico derivado da colchinina que inibe a polimerização do fuso acromático, por dissolução da tubulina e paragem do ciclo celular em metáfase, com dispersão dos cromossomas pelo núcleo. Posteriormente é adicionada uma solução hipotónica que lisa a membrana das células, com consequente obtenção de uma suspensão nuclear e intumescimento dos núcleos (com maior dispersão dos cromossomas). Seguidamente é adicionada a solução de Carnoy, uma solução fixadora de metanol e ácido acético na proporção 3:1, que elimina os restos celulares e citoplasmáticos em solução. Por fim é realizado o espalhamento das amostras em lâminas, que ficam a incubar a 65° C *overnight*.

Para uma melhor distinção dos cromossomas são usadas técnicas de bandeamento, como das bandas G. Nesta técnica é usada tripsina que lisa parcialmente o material genético, com intercalação entre as bases de DNA, que são depois coradas com Giemsa. As regiões mais escuras são ricas em adenina e timina (zonas pobres em genes) e as mais claras em guanina e citosina.

A visualização das lâminas e captura de imagens é feita com recurso a um microscópio eletrónico com ligação a um computador, para o qual são exportadas as imagens que são posteriormente analisadas no *software* IKAROS *karyotyping*. Este programa permite a identificação dos cromossomas e a realização do cariótipo. Pela análise do cariótipo podem ser detetadas alterações numéricas, como monossomias e trissomias, e alterações estruturais, como translocações e deleções. O diagnóstico é feito com base na observação de pelo menos 20 metafases com a mesma alteração.

Por outro lado, a Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) surgiu como uma técnica de citogenética molecular mais rápida e complementar à citogenética convencional. Contudo,

durante o tempo de estágio não tive oportunidade de acompanhar os técnicos que realizam esta técnica.

#### 4.5 CASO CLÍNICO

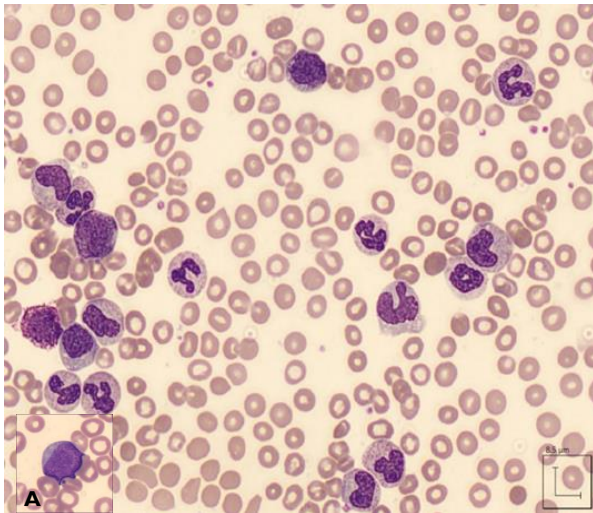
Indivíduo do sexo masculino, com 21 anos de idade, é referenciado ao serviço de urgência do Hospital Universitário de Coimbra devido a alterações em análises de rotina. No serviço de urgências relatou desconforto a nível do hipocôndrio esquerdo, na projeção esplénica e episódios de sudorese sem febre. No exame físico demonstrou-se consciente, colaborante e orientado no tempo e no espaço. A pele e as mucosas estavam hidratadas e coradas. Na auscultação cardíaca e pulmonar não se detetaram alterações. No exame abdominal, o abdómen estava mole e depressível indolor à apalpação, sem organomegalias palpáveis. Como exame complementar foi solicitado uma ecografia abdominal onde foi observado esplenomegalia. Foram solicitados exames laboratoriais, estando o hemograma representado na Tabela 6.

**Tabela 6-** Hemograma do paciente

Parâmetro	Resultado	Unidades	Valores de referência
Leucócitos	169,4	$\times 10^9/L$	3,9-10,2
Eritrócitos	3,52	$\times 10^{12}/L$	4,5-5,9
Hemoglobina	10,6	g/dL	13,5-17,5
Hematócrito	30,5	%	41-53
VCM	86,6	fL	80-100
HCM	30,1	pg	26-34
CHCM	34,8	g/dL	31-37
RDW	16,9	-	11,5-15

Pela análise dos resultados verificou-se que o doente se encontrava com uma leucocitose marcada, anemia normocítica e normocrômica acompanhada de anisocitose eritrocitária.

Posteriormente foi solicitada a realização de um esfregaço de sangue periférico. Pela contagem celular, representada na Tabela 7, e observação do esfregaço, representado na Figura 18, confirma-se a marcada leucocitose, predomínio de mielócitos e metamielócitos neutrofilicos, basofilia e eosinofilia, assim como a presença de blastos.

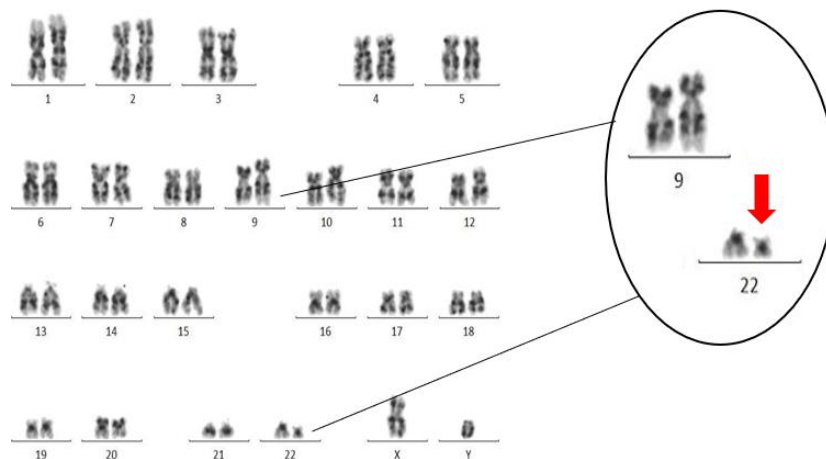


**Figura 18-** Esfregaço de sangue periférico corado pela coloração de May-Grunwald-Giemsa onde se observam mielócitos e metamielócitos neutrofilicos, neutrófilos, um basófilo e um promielócito. Observa-se uma célula sugestiva de blasto (A) e anisocitose eritrocitária. Fotografia obtida no CHUC durante o estágio.

**Tabela 7-** Contagem celular realizada no esfregaço de sangue periférico do doente pelo patologista clínico.

Parâmetro	Resultado	Unidades	Porcentagem determinada
Neutrófilos	92,2	$\times 10^3/\mu\text{L}$	54,4
Linfócitos	5,9	$\times 10^3/\mu\text{L}$	3,5
Monócitos	3,4	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2,0
Eosinófilos	3,4	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2,0
Basófilos	5,9	$\times 10^3/\mu\text{L}$	3,5
Blastos	2,5	$\times 10^3/\mu\text{L}$	1,5
Promielócitos	4,2	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2,5
Mielócitos	41,0	$\times 10^3/\mu\text{L}$	24,2
Metamielócitos	10,8	$\times 10^3/\mu\text{L}$	6,4

Posto isto, suspeita-se de uma neoplasia mieloproliferativa e como tal, foi solicitado um cariógrama.



**Figura 19-** Cariograma do doente onde está demonstrada a  $t(9;22)(q34,q11)$ . O cromossoma Ph está assinalado com a seta vermelha.

No cariógrama detetou-se a presença do cromossoma de Philadelphia (Ph), em todas as metáfases analisadas, que resulta de uma translocação balanceada entre os braços longos do cromossoma 9 e do cromossoma 22. Posteriormente foi realizada a pesquisa por PCR do gene de fusão BCR-ABL1. E consoante os locais de quebra nos genes ABL e BCR, o gene de fusão BCR-ABL1 formado, origina uma de 3 oncoproteínas (p190, p210, p230), tendo sido detetada a oncoproteína p210.

Assim, a presença da  $t(9;22)(q34,q11)$  que origina o gene de fusão BCR-ABL1 e que codifica a oncoproteína p210 faz diagnóstico de Leucemia Mielóide Crónica (LMC). A LMC é um distúrbio clonal das células estaminais pluripotentes e corresponde a aproximadamente 15% das leucemias<sup>3</sup>. Tem maior prevalência na faixa etária entre os 50-60 anos, mas pode



ocorrer em qualquer momento da vida, como é demonstrado pelo jovem representado neste caso clínico.

## **5. IMUNOLOGIA**

A imunologia corresponde ao estudo dos componentes do organismo responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de antígenos estranhos, assim como o modo como estes componentes atuam e interagem e ainda as consequências dessas interações. Estuda ainda as formas como o sistema imunitário pode ser manipulado para proteção e tratamento de patologias.

O sistema imunitário é composto por 3 linhas de defesa: a primeira são as barreiras físicas, como a pele; a segunda corresponde ao sistema imunitário inato e a terceira ao sistema imunitário adquirido. Tanto o sistema imunitário inato quanto o adquirido são compostos pela parte celular, assim como por uma parte humoral.

No setor da Imunologia do SPC-CHUC são processadas amostras de soro, LCR e de fezes, no entanto as de soro representam o maior volume de trabalho. Este setor encontra-se subdividido em dois sub-setores: a autoimunidade e a imunologia/ imunoalergologia.

### **5.1 AUTOIMUNIDADE**

Neste setor, após a separação de duas alíquotas de soro de cada tubo primário, é adicionada uma gota de azida de sódio, para preservar os anticorpos (Ac) presentes, em cada uma das alíquotas. Uma é processada no dia, enquanto a outra é conservada a -20° C por 5 meses.

O processo laboratorial é feito em duas fases: a primeira é a fase de despiste na qual é realizado um ensaio multiespecífico por imunofluorescência indireta (IFI) em lâmina, e uma segunda fase de confirmação por meio de ensaios mais específicos como ELISA, Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA), Immunoblot ou quimioluminescência (CLIA). Na Tabela 8 estão descritos os equipamentos, respectivas metodologias e principais doseamentos.

**Tabela 8-** Equipamentos, metodologias e principais doseamentos realizados no sub-setor de Autoimunidade

<b>Equipamento</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Doseamento</b>
<b>BIO-FLASH®</b>	CLIA	Ac anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA), Ac anti-membrana basal glomerular, Ac anti-cardiolipinas (IgG e IgM)
<b>ImmunoCAP250®</b>	FEIA	Ac anti-mieloperoxidase (MPO), Ac anti-proteinase 3 (PR3), Ac anti-piruvato desidrogenase M2 IgG, calprotectina nas fezes
<b>IF Sprinter®</b>	IFI	Ac antinucleares (ANA), Ac anti-músculo liso (ASMA), Ac anti-microsomas renais e hepáticos (anti-LMK1), Ac anti-mitocôndrias (AMA), Ac anti-citoplasma de granulócitos (ANCA)
<b>Analysier I® QUANTA-Lyser 3000®</b>	ELISA	Ac anti-histonas, Ac anti-LCI, Ac anti- Fator Intrínseco

## 5.2 IMUNOLOGIA/ IMUNOALERGOLOGIA

Neste sub-setor são feitos doseamentos imunoquímicos e são também realizados proteinogramas e imunofixações, séricos e urinários.

Nos pedidos de proteinogramas urinários são usadas amostras de urina de 24h, e devido à normal baixa concentração de proteínas neste produto biológico, é necessário concentrar a amostra em tubos concentradores específicos. Na Tabela 9 estão descritos os equipamentos, respectivas metodologias e principais doseamentos.

**Tabela 9-** Equipamentos, metodologias e principais doseamentos realizados no sub-setor de Imunologia/ Imunoalergologia

<b>Equipamento</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Doseamento</b>
<b>Otilite</b>	Turbidimetria	CH50, Subclasses IgA, cadeias leves livres, <i>heavylite</i>
<b>Phadia 250</b>	FEIA	IgE e IgG específicas e Triptase
<b>BN ProSpec I</b>	Neflometria	Haptoglobina, Cistatina, Fator Reumatóide, Subclasses IgG, Cadeias k e λ na urina, β2-microglobulina na urina
<b>BN ProSpec II</b>		IgA, IgG, IgM, IgD, complemento CIq e CI inibidor, ADNase
<b>Hydrasys 2 e Hydrasys 2 SCAN FOCUSING</b>	Eletroforese	Proteínas no soro, urina e LCR
<b>ELISA DS2™</b>	ELISA	Elastase fecal e atividade funcional do inibidor de CI

Os proteinogramas são normalmente solicitados quando existe suspeita da presença de uma gamopatia monoclonal, como o Mieloma Múltiplo. Quando é detetado um pico na fração gama das globulinas, realiza-se uma imunofixação para se identificar quais as cadeias alteradas.

## 6. MICROBIOLOGIA

O termo microbiologia deriva do grego: *mikros* (“pequeno”), *bios* (“vida”) e *logos* (“ciência”). Assim, a microbiologia é o ramo da biologia que estuda as características morfológicas, metabólicas, reprodutivas e relacionais dos microrganismos.

O setor de Microbiologia do SPC-CHUC encontra-se dividido nos seguintes sub-setores: Bacteriologia, Parasitologia, Micologia, Micobacteriologia, Serologia e Biologia Molecular.

Assim que as amostras chegam ao laboratório são triadas e integradas no sistema informático Clinidata e, aquando deste processo, é importante verificar:

- Identificação correta;
- Contentor adequado;
- Frascos/contentores bem fechados e selados;
- Zaragatoas vêm no meio de transporte adequado;
- Volume suficiente de amostra;
- Condições de transporte e conservação (p.e tempo desde a colheita até ao processamento).

Se algum destes parâmetros não se verificar deve-se rejeitar a amostra e pedir nova colheita, caso contrário estas situações podem comprometer os resultados. Se todos os parâmetros se verificarem, as amostras são direcionadas para os respetivos sub-setores de acordo com os seus pedidos.

### 6.1 BACTERIOLOGIA

A bacteriologia é o ramo da microbiologia que se dedica ao estudo das bactérias, isto é, ao estudo das suas características morfológicas, bioquímicas, metabólicas, genéticas, entre outras, assim como dos mecanismos através dos quais causam doença ou desenvolvem resistência aos antibióticos.

O processo laboratorial em bacteriologia tem como objetivo promover o crescimento, o isolamento, a identificação e consequente teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) dos microrganismos presentes nas amostras e que possam representar potenciais agentes etiológicos.

Para o crescimento dos microrganismos presentes nas amostras são inoculados diferentes meios de cultura por diferentes técnicas com o objetivo de obter colónias puras e isoladas. A partir destas colónias, é feita a sua identificação num sistema automatizado, o MALDI Biotyper<sup>®</sup> (Bruker), e o respetivo TSA, maioritariamente pelo sistema MicroScan

WalkAway. Salvo algumas exceções de microrganismos para os quais o sistema automático não está validado, e por isso é efetuado o TSA manual. Simultaneamente é preparado um esfregaço da amostra para avaliação microscópica, uma vez que permite orientar o diagnóstico e a terapêutica empírica.

## **6.1.1 Diagnóstico Laboratorial**

### **6.1.1.1 Exame Direto**

O exame microscópico direto das amostras fornece informações importantes quanto à forma, tamanho e tipo de agrupamento das bactérias, além do comportamento tintorial que as bactérias adquirem após coloração de Gram. Conjugando estas informações com o tipo de amostra e a microbiota típica do local anatómico de onde foi colhida, é possível dar uma orientação quanto ao provável microrganismo patogénico presente. Assim, este exame assume grande importância clínica porque auxilia nos procedimentos seguintes e orienta a terapia empírica.

### **6.1.1.2 Exame Cultural**

O exame cultural tem como objetivo o crescimento, isolamento, identificação de bactérias clinicamente relevantes e avaliação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos.

As bactérias possuem diferentes necessidades nutricionais e ambientais, pelo que é necessário adequar variáveis, como os meios de cultura, a disponibilidade de oxigénio ou dióxido de carbono, a temperatura e humidade de incubação, para potenciar e otimizar o seu crescimento.

Os meios de cultura podem ser classificados como meios de enriquecimento, seletivos e diferenciais. Quanto à percentagem de agar, são classificados em líquidos, semi-sólidos ou sólidos.

As técnicas de sementeiras aplicadas variam com o tipo de produto biológico e do objetivo da cultura. O tipo de sementeira maioritariamente realizada em meio sólido é por esgotamento do produto à superfície de meio sólido, com auxílio de uma ansa de 10 µL ou de uma zaragatoa, no entanto existem algumas exceções. Nas amostras de urina é realizada uma sementeira de semi-quantificação, com uma ansa calibrada de 1 µL e com a qual se faz uma estria radial seguida de estrias estreitas ao longo de toda a placa, que permita a quantificação das colónias. Outras amostras como o líquido cefalorraquidiano (LCR) exigem uma sementeira por inundação para aumentar as probabilidades de isolar os microrganismos presentes e é usada uma pipeta para colocar 2 a 3 gotas do líquido biológico sobre o meio.

Quanto aos meios líquidos, a inoculação é feita por adição direta de amostra no meio, seguida de uma homogeneização por inversão.

Após a inoculação dos meios de cultura, a maioria dos meios são incubados numa estufa a 37° C, por 18 a 24 horas e atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Algumas das exceções são o meio de *Campylobacter* (CAM) que é incubado numa estufa a 42° C, por 48 a 72 horas numa atmosfera microaerófila e os meios inoculados com amostras de urina e fezes são incubados numa estufa a 37° C, por 18 a 24 horas numa atmosfera normal<sup>19</sup>.

Após o período de incubação os meios são avaliados macroscopicamente e é verificada a necessidade de prolongar o tempo de incubação ou ainda repicagem para outros meios de cultura.

### **6.1.1.3 Identificação**

A identificação dos agentes patogénicos inicia-se com a interpretação do crescimento das culturas após o tempo de incubação. É também estabelecida uma correlação entre o crescimento bacteriano nos meios de cultura e o que foi observado no exame direto após coloração de Gram. No laboratório de bacteriologia a identificação microbiana é realizada no aparelho MALDI Biotyper<sup>®</sup> (Bruker).

#### **MALDI Biotyper<sup>®</sup> (Bruker)**

O MALDI Biotyper<sup>®</sup> é um sistema automatizado de identificação microbiana por espetrometria de massa que utiliza a técnica *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of flight* (MALDI-TOF). Permite uma identificação rápida a partir de colónias isoladas e fornece informações ao nível do género e espécie.

Neste sistema são utilizadas placas com 96 poços, em que é aplicado num poço o controlo de qualidade, *Bacterial Test Standard* (BTS), e nos restantes uma pequena quantidade de uma colónia isolada juntamente com uma matriz química que lisa e se co-cristaliza com a amostra. Esta mistura é deixada a secar e posteriormente, a placa é colocada no analisador. Antes de iniciar uma “corrida”, o sistema verifica o controlo de qualidade e, se bem-sucedido, inicia automaticamente a análise das amostras. Sobre cada poço incidem pequenos pulsos de lasers UV que ionizam as amostras formando iões em fase gasosa, que posteriormente são sujeitos a um processo de aceleração através de um campo elétrico num tubo de vácuo. O intervalo que cada partícula demora até chegar ao detetor, o designado “*time of flight*”, depende da sua massa e carga. Assim que todas as proteínas presentes são detetadas pelo espetrómetro de massa, é produzido um espetro específico do microrganismo que está a ser

analisado. Por fim, o espectro formado é comparado com uma base de dados de referência permitindo a identificação do microrganismo em estudo<sup>20</sup>.

#### 6.1.1.4 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA)

O TSA é realizado para determinar a antibioterapia eficaz para o tratamento de infeções causadas pelos microrganismos previamente identificados nas amostras biológicas. Com o aumento das resistências bacterianas a múltiplos fármacos, os TSA assumiram um papel fundamental na melhoria das respostas clínicas e na assistência aos doentes.

A realização e interpretação dos resultados obtidos são feitas com base nas normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*.

Os TSA são realizados automaticamente no MicroScan WalkAway (Beckman Coulter), ou manualmente.

#### MicroScan WalkAway

O MicroScan WalkAway é um sistema automatizado de TSA que utiliza painéis de microdiluição que contêm substratos metabólicos e antibióticos liofilizados para testar a atividade bioquímica e a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas.

Primeiramente é realizada uma suspensão bacteriana de 0,5 McFarland e de seguida é adicionada uma alíquota a cada poço do painel, que apresenta diluições em série dos antibióticos a testar. Após incubação a 37° C por 18 ± 2h, é realizada a leitura da densidade dos poços de modo a avaliar o crescimento bacteriano por absorvância. É disponibilizada a concentração mínima inibitória (CMI) para cada antibiótico, o que permite classificar a bactéria como sensível, intermédia ou resistente.

No laboratório de bacteriologia estão disponíveis os painéis descritos na Tabela 10.

**Tabela 10-** Painéis de Suscetibilidade Antimicrobiana do MicroScan WalkAway

Painéis de Suscetibilidade Antimicrobiana	
PM STA 36	Utilizado para <i>Staphylococcus</i> spp.
PM E 37	Utilizado para <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus agalactiae</i>
MSTP 36	Utilizado para <i>Streptococcus</i> spp.
Gram -	Utilizado para bactérias de Gram negativo

#### TSA manual

Para o TSA manual é usado o método de difusão em disco baseado na técnica de Kirby-Bauer, e/ou as tiras de E-teste. Em ambas as técnicas realiza-se uma suspensão bacteriana com turvação idêntica à escala 0,5 McFarland, que posteriormente é usada para inocular a gelose de Mueller Hinton (MHE) utilizando a técnica de sementeira em toalha. No caso de bactérias

fastidiosas pode ser necessário utilizar a gelose de Mueller Hinton com 5% de sangue de cavalo (MHF).

No método de difusão em disco, os antibióticos impregnados nos discos difundem-se radialmente e produzem um gradiente de concentração que vai diminuindo com o aumento da distância ao centro do disco. Após incubação, os diâmetros dos halos produzidos pela inibição antimicrobiana no crescimento bacteriano são medidos e o resultado é interpretado segundo os critérios predefinidos pela EUCAST como suscetível, intermédio ou resistente.

No caso do E-teste são usadas tiras impregnadas de antibiótico com várias concentrações, que contêm uma escala a partir da qual se determina a CMI. A CMI é medida a partir do ponto de interseção entre a zona elíptica de inibição e a escala dos valores da tira. O E-teste comparativamente ao método de difusão em disco é o mais utilizado uma vez que tem a vantagem de fornecer a CMI.

## **6.1.2 Amostras**

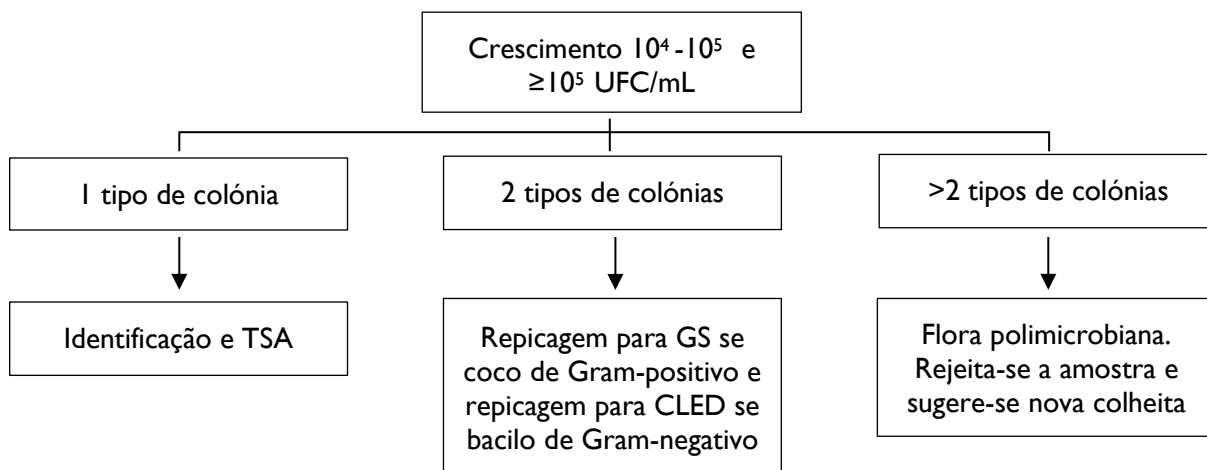
### **URINA**

Para o diagnóstico de infeções do trato urinário, a amostra de urina pode ser obtida através de sacos coletores, drenagem de nefrostomia, punção supra-púbica, punção de cateter urinário e, a mais comum, por micção e recolha de “jato intermédio”<sup>19</sup>. Após a colheita, a amostra é transferida para tubos que contêm ácido bórico, que funciona como agente conservante bacteriostático.

Assim que as amostras chegam ao laboratório é realizada a análise da urina tipo II no analisador Sysmex UF-5000<sup>TM</sup>. Este, através da técnica de citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor e foco hidrodinâmico, deteta a presença de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, bactérias, leveduras, cilindros, entre outros. Entre os vários parâmetros destacam-se a presença de bactérias e o número de leucócitos, uma vez que são os mais importantes para a decisão da realização da urocultura. Quando uma amostra é considerada positiva, esta é encaminhada para o aparelho DxM Autoplak System que realiza automaticamente a sementeira com uma ansa calibrada de 1 µL nos meios de cultura gelose de sangue (GS) e CLED, previamente identificados com o número da amostra. Posteriormente, as placas são colocadas a incubar numa estufa a 37° C, em atmosfera normal por 18-24h.

Após incubação procede-se à interpretação quantitativa das colónias, isto é, 0-10 colónias correspondem a <10<sup>4</sup> UFC/mL, 10-100 colónias correspondem a 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> UFC/mL e >100 colónias correspondem a ≥10<sup>5</sup> UFC/mL. Na maioria dos casos, o conjunto de passos que se realizam após observação de um crescimento de 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> e de ≥10<sup>5</sup> UFC/mL é o

representado na Figura 20. No entanto existem algumas exceções relativamente à valorização desta contagem que se prendem, principalmente com a idade, sexo, história clínica, gravidez, hora de colheita, método de colheita, entre outros. Por exemplo uma urina colhida por punção supra-púbica, excluindo contaminação por bactérias comensais da pele, deverão ser valorizadas quaisquer espécies de bactérias isoladas independentemente da sua quantificação.



**Figura 20-** Interpretação e procedimentos seguintes a adotar na avaliação de uroculturas. (TSA – Teste de Suscetibilidade aAntimicrobianos; GS – Gelose de Sangue)

As infeções do trato urinário (ITU) são uma das mais frequentes no ser humano. A infeção urinária aguda é normalmente causada por bactérias da microbiota intestinal, que invade o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. Por este motivo as ITU são mais frequentes em indivíduos do sexo feminino devido à própria anatomia corporal.

As ITU podem ocorrer ao nível do trato urinário inferior, como a cistite (infeção da bexiga), ou a nível do trato urinário superior, como a pielonefrite (infeção dos rins). Existem três vias de acesso, a hematogénea, linfática e, a mais comum, a via ascendente.

Os agentes etiológicos mais comuns em indivíduos, sem outras doenças associadas, são bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp.), *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus* spp..

## FEZES

As infeções gastrointestinais podem ter origem em diversos agentes microbianos como bactérias, vírus ou parasitas. Têm uma alta incidência na população em geral, mas com grande morbidade em determinados grupos etários (crianças e idosos).

A principal forma de transmissão ocorre pela via fecal-oral através do consumo de alimentos e águas contaminadas. As manifestações clínicas ocorrem devido à multiplicação dos agentes microbianos e/ou devido à produção de toxinas que podem invadir a mucosa intestinal e/ou a corrente sanguínea.



Os agentes etiológicos têm vindo a alterar-se devido a vários fatores tais como o aumento de movimentos migratórios, mais frequência de viagens intercontinentais, assim como mudanças nos hábitos alimentares. O histórico de viagens, a existência de fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos, como a diarreia, são importantes na orientação da pesquisa do agente etiológico<sup>19</sup>. As bactérias que mais frequentemente causam este tipo de infeções são: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica*.

No laboratório de bacteriologia realiza-se o exame macroscópico das fezes, cropocultura, o isolamento de colónias puras e a respetiva identificação dos agentes microbianos.

É necessário ter sempre presente a diversidade da microbiota intestinal para saber quais os microrganismos a valorizar neste tipo de amostras. A Tabela II mostra o processamento de amostras de fezes e a Figura 21 ilustra um isolamento de *Campylobacter jejuni* no meio CAM.



**Figura 21-** Isolamento de *Campylobacter jejuni* no meio CAM. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio

**Tabela II-** Processamento de amostras de fezes

<b>Exame macroscópico</b>	Observar o aspeto, consistência e a cor da amostra	
<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b>	Caldo de Bacilos de Gram negativos (CBGN) Gelose <i>Salmonella-Shigella</i> (SS) Gelose Hektoen (HE) Gelose <i>Campylobacter</i> (CAM) Gelose <i>Yersinia</i> (CIN)
	<b>Processamento</b>	Sementeira por esgotamento de produto Suspensão em meio líquido
	<b>Incubação</b>	18-24h a 37° C em anaerobiose, exceto o CAM que é incubado por 48-72h a 42°C em atmosfera microaerofílica. Após 24h, a partir do CBGN repicar para SS e HE.

## SANGUE

O sangue é um produto estéril, pelo que o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infeção. No entanto, hemoculturas positivas nem sempre correspondem a uma verdadeira infeção, uma vez que podem ser falsos-positivos resultantes da contaminação das amostras por microbiota comensal da pele, como *Staphylococcus coagulase negativo*, durante a colheita.

Muitas doenças infecciosas decorrem com bacteriemia que corresponde à presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea. A bacteriemia pode ser transitória, intermitente ou persistente<sup>21</sup>.

O número e o intervalo entre as colheitas de sangue dependem da situação clínica do doente. Habitualmente são colhidas duas a três amostras de locais anatómicos diferentes para garrafas de hemocultura diferentes. O volume de sangue colhido é crítico porque a concentração de bactérias é baixa na maioria das bacteriemias principalmente se o doente está sob antibioterapia. Geralmente o volume recomendado por garrafa em adultos é 5-10 mL e nas crianças, como a concentração de bactérias durante o período de bacteriemia é mais alta, 1-5 mL<sup>19</sup>.

As garrafas de hemocultura contêm 30 mL de agar de tripticase de soja suplementado e 0,035% de polietilsulfonato de sódio (substância anticoagulante). Estas são colocadas no BACT/ALERT<sup>®</sup>3D que corresponde a um sistema automático de deteção microbiana baseado numa tecnologia colorimétrica. Cada garrafa possui um sensor de CO<sub>2</sub> que está separado do meio de cultura por uma membrana semipermeável. O CO<sub>2</sub> produzido pelo crescimento microbiano difunde-se através da membrana até ao sensor e dissolve-se em água, produzindo iões H<sup>+</sup>. Assim, quanto mais CO<sub>2</sub> é libertado, maior a produção de iões H<sup>+</sup> que, por conseguinte, provocam uma diminuição do pH. Esta acidificação por sua vez provoca uma alteração da cor do sensor de cinza para amarelo<sup>22</sup>, que corresponde a um resultado positivo.

As garrafas são continuamente agitadas e incubadas a 37 °C, por 5 dias durante os quais são realizadas leituras de 10 em 10 minutos. Quando é detetado crescimento, o aparelho sinaliza a garrafa que deve ser retirada para prosseguir com estudos de identificação do agente microbiano. As hemoculturas são consideradas negativas se ao fim de 5 dias não se tiver detetado nenhum crescimento. A Tabela 12 mostra o processamento de amostras de sangue de hemoculturas positivas.

**Tabela 12-** Processamento de amostras de sangue de hemoculturas positivas

<b>Hemocultura positiva</b>	<b>Exame microscópico</b>	Esfregaço corado com coloração de Gram
	<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b> GS
		<b>Processamento</b> Sementeira por esgotamento de produto
		<b>Incubação</b> Atmosfera de 5-7% de CO <sub>2</sub> a 37°C, durante 24- 48h

No caso de culturas positivas em que se observa um tipo de colónia deve-se prosseguir para a identificação e TSA. Os principais microrganismos responsáveis por este tipo de infeção são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* spp.. Porém, quando se observa um tipo

de colônia característica de *Staphylococcus coagulase negativa* deve-se realizar a identificação caso se confirme a sua presença em duas ou mais hemoculturas ou se a história clínica do doente o justificar (por exemplo em doentes transplantados).

### Líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido estéril com reduzido número de leucócitos e proteínas, como as imunoglobulinas e, por isso, a sua capacidade de defesa contra microrganismos invasores é baixa.

As infecções do sistema nervoso central (SNC) são graves e geralmente provocadas pela passagem dos microrganismos através das barreiras de defesa naturais. As infecções mais comuns são a meningite, que corresponde à inflamação das meninges, e a encefalite, que corresponde à inflamação do encéfalo<sup>23</sup>.

As amostras de LCR são obtidas por punção lombar e devem ser enviadas imediatamente para o laboratório após a colheita, e mantidas à temperatura ambiente. São, normalmente, colhidas três amostras para o estudo citológico, bioquímico e microbiológico. Assim que chegam ao laboratório, as amostras são centrifugadas, de modo a aumentar as probabilidades de detecção microbiana no exame microscópico e cultural. A Tabela 13 mostra o processamento de amostras de LCR.

**Tabela 13-** Processamento de amostras de líquido cefalorraquidiano

<b>Exame macroscópico</b>	Observar a cor e a turbidez da amostra	
<b>Exame microscópico</b>	Esfregaço corado com coloração de Gram	
<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b>	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI) GS Gelose de chocolate com Polyvitex (PVX)
	<b>Processamento</b>	Sementeira por inundação Suspensão em meio líquido
	<b>Incubação</b>	Atmosfera de 5% de CO <sub>2</sub> a 37°C, durante 48h. O BHI é incubado em aerobiose a 37°C, durante 48h. Após 48h, a partir do BHI, repicar para GS e PVX.

Os agentes bacterianos mais frequentemente isolados são *Streptococcus agalactiae* e *Listeria monocytogenes* em recém-nascidos, *Neisseria meningitidis* em jovens adultos e *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* em crianças e idosos<sup>24</sup>.

### OUTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

Os líquidos biológicos são normalmente estéreis, pelo que qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. A interpretação dos resultados deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado.

Os líquidos lípidos devem ser concentrados, por centrifugação, enquanto os com aspecto purulento podem ser inoculados diretamente nos meios de cultura. A execução de um esfregaço corado pela coloração de Gram é muito útil para analisar os microrganismos presentes, como também o tipo de leucócitos, uma vez que são sugestivos do agente etiológico da infecção<sup>24</sup>. Nas Tabelas 14 e 15 é apresentado o processamento das amostras de líquido pleural e peritoneal e sinovial, respectivamente.

**Tabela 14-** Processamento de líquido pleural

<b>Exame microscópico</b>	Esfregaço corado com coloração de Gram	
<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b>	BHI GS PVX
	<b>Processamento</b>	Sementeira por esgotamento de produto Suspensão em meio líquido
	<b>Incubação</b>	Atmosfera de 5% de CO <sub>2</sub> a 37°C, durante 18-24/48h. O BHI é incubado em aerobiose a 37°C, durante 24h. Após 24h, a partir do BHI, fazer um esfregaço corado com coloração de Gram e repicar para GS.

**Tabela 15-** Processamento de líquido peritoneal e sinovial

<b>Exame microscópico</b>	Esfregaço corado com coloração de Gram	
<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b>	<i>Cooked meat</i> (CM) GS Gelose CNA
	<b>Processamento</b>	Sementeira por esgotamento de produto Suspensão em meio líquido
	<b>Incubação</b>	Atmosfera de 5% de CO <sub>2</sub> a 37°C, durante 18-24/48h. O CM é incubado em aerobiose a 37°C, durante 24h. Após 24h, a partir do CM, fazer um esfregaço corado com coloração de Gram e repicar para CLED, GS e meios de cultura para bactérias anaeróbias.

## **AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS: EXPETORAÇÃO, ASPIRADO TRANSTRAQUEAL E LAVADO BRÔNQUICO OU BRONCO-ALVEOLAR**

As infecções do trato respiratório variam com o local anatômico da infecção e assim são agrupadas em infecções do trato respiratório superior e do trato respiratório inferior. Neste relatório irei abordar as infecções do trato respiratório inferior.

O diagnóstico das infecções respiratórias inferiores é comumente dificultado pela contaminação das amostras por microbiota comensal da orofaringe durante o momento da colheita. Assim, para que o laboratório processe apenas amostras de boa qualidade, estas amostras são inicialmente avaliadas por exame direto a fresco ao microscópio com objetiva

de 10x para analisar as suas características, nomeadamente a presença de leucócitos, células epiteliais e o tipo de flora bacteriana presente. A classificação das amostras baseia-se nos critérios propostos por Murray e Washington<sup>24</sup>, apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16-** Tabela de Murray e Washington

Grupo	Células epiteliais	Leucócitos
1	>25	<10
2	>25	10-25
3	>25	>25
4	10-25	>25
5	<10	>25

Segundo os critérios propostos devem ser processadas amostras que estejam inseridas nos grupos 4 ou 5, uma vez que apresentam boa qualidade. Estas amostras são processadas de acordo com o exposto nas Tabelas 17 e 18.

**Tabela 17-** Processamento de expetorações e aspirados transtraqueais

<b>Exame microscópico</b>	Esfregaço corado com coloração de Gram	
<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b>	GS Gelose chocolate seletiva para <i>Haemophilus</i> spp. (HAE) Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC)
	<b>Processamento</b>	Sementeira por esgotamento de produto
	<b>Incubação</b>	Atmosfera de 5-7% de CO <sub>2</sub> a 37°C, durante 18-24/48h

**Tabela 18-** Processamento de lavados brônquicos e bronco-alveolares

<b>Exame microscópico</b>	Esfregaço corado com coloração de Gram	
<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b>	GS HAE PVX
	<b>Processamento</b>	Sementeira por esgotamento de produto
	<b>Incubação</b>	Atmosfera de 5-7% de CO <sub>2</sub> a 37°C, durante 18-24/48h

Os patógenos frequentemente causadores de infeções do trato respiratório inferior são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* e Enterobacteriaceae<sup>23</sup>.

## EXSUDADO VAGINAL, URETRAL E RETAL

A amostra adequada para o diagnóstico de infeções do trato genital depende do local da infeção e dos microrganismos. Algumas infeções têm origem em microrganismos

endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrios da microbiota comensal.

O processamento laboratorial destas amostras inicia-se com o exame cultural, seguindo-se da realização de um esfregaço a fresco, para observar a presença ou não de *Trichomonas vaginalis* nos exsudados vaginais, e também esfregaços corados com a coloração de Gram. A Tabela 19 apresenta o processamento de exsudados vaginais, uretrais e retais.

**Tabela 19-** Processamento de exsudados vaginais, uretrais e retais

<b>Exame microscópico</b>	Exame direto a fresco (exsudados vaginais)	
	Esfregaço corado com coloração de Gram	
<b>Exame cultural</b>	<b>Meio de cultura</b>	GS Meio de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (VCAT) Meio CNA
	<b>Processamento</b>	Sementeira por esgotamento de produto
	<b>Incubação</b>	Atmosfera de 5-7% de CO <sub>2</sub> a 37°C, durante 24-48h, exceto a GS que é incubada em aerobiose a 37°C, durante 24-48h.

Os principais microrganismos responsáveis por infeções vaginais são *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp., *Candida* spp., *Trichomonas vaginalis* e *Streptococcus agalactiae*. A Figura 22 ilustra o isolamento de *Candida albicans* no meio Sabouraud com Cloranfenicol e Gentamicina (SCG), meio seletivo para o isolamento de fungos. Quanto às infeções uretrais e retais o principal agente etiológico é a *Neisseriae gonorrhoeae*<sup>19</sup>. Ainda assim, a valorização clínica das culturas deve ser efetuada de acordo com a informação clínica do doente e das observações do exame direto a fresco e após coloração.



**Figura 22-** Isolamento de *Candida albicans* no meio SGC. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio

## 6.2 MICOBACTERIOLOGIA

As bactérias do género *Mycobacterium* são bacilos aeróbios estritos, imóveis e não formadores de esporos. A sua parede celular contém uma elevada percentagem de ácidos micólicos, que correspondem a ácidos gordos de cadeia longa, aos quais se encontram ancorados um grande número de lipopolissacarídeos e proteínas, e que conjuntamente atuam como uma forte barreira à permeabilidade celular. Os ácidos micólicos complexam-se facilmente com os corantes básicos resistindo à descoloração por soluções ácidas, utilizadas na coloração de Gram, e por esta razão, estas bactérias são classificadas como álcool-ácido resistentes (BAAR)<sup>25</sup>.

Existem mais de 126 espécies pertencentes ao género *Mycobacterium*, no entanto as pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*, são estritamente patogénicas. Além de que este complexo é o paradigma das micobactérias de crescimento lento<sup>25</sup>.

### **6.2.1 Diagnóstico laboratorial**

As principais amostras utilizadas para a pesquisa de micobactérias são do trato respiratório (expetoração, aspirados e lavados), mas também podem ser amostras de urina, fezes, sangue, suco gástrico, LCR ou outros líquidos biológicos.

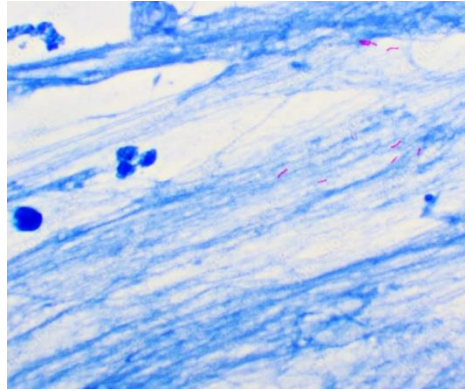
O diagnóstico laboratorial baseia-se na deteção microscópica, no isolamento de bacilos álcool-ácido resistentes obtidos por cultura e na sua identificação por técnicas moleculares.

#### **6.2.1.1 Tratamento das amostras**

As amostras sofrem um pré-tratamento que envolve a homogeneização, descontaminação e concentração. No laboratório de micobacteriologia do CHUC é utilizado o kit de descontaminação BD BBL MycoPrep que contém hidróxido de sódio (NaOH) e N-acetil-L-cisteína (NALC), que são agentes mucolíticos. Contém também citrato de sódio, para ligar iões de metais pesados que possam estar presentes na amostra e que inativem o NALC, e ainda tampão fosfato, para parar a atividade dos agentes mucolíticos. Depois as amostras são concentradas por centrifugação a 3000g durante 15 minutos, sendo apenas utilizado o sedimento. As amostras de líquidos normalmente estéreis, como o LCR, podem ser diretamente centrifugadas, para posterior examinação microscópica e inoculação do meio de cultura.

#### **6.2.1.2 Exame direto**

A deteção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) por microscopia continua a ser o método de diagnóstico mais simples e rápido. Tipicamente, as colorações aplicadas a BAAR são as colorações de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun, sendo a última a utilizada no laboratório do CHUC. Nestas técnicas é usado um corante primário, a fucsina, álcool-ácido como agente descolorante e o azul-de-metileno como corante de contraste. Assim, as bactérias do género *Mycobacterium* adquirem a coloração do corante primário, vermelho, enquanto as restantes bactérias adquirem a coloração do corante de contraste, azul<sup>25</sup>.



**Figura 23-** Esfregaço de expetoração de um doente corado pela técnica de Ziehl-Neelsen, onde se observam bacilos álcool-ácido resistentes corados de vermelho pela fucsina (x1000). Fonte: <https://stock.adobe.com/images/mycobacterium-tuberculosis-positive-small-red-rod-in-sputum-smear-acid-fast-stain-analyze-by-microscope/302941283>

### 6.2.1.3 Cultura

#### A) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

O *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT) contém caldo Middlebrook 7H9 suplementado com uma mistura de antibióticos. Esta mistura é constituída por polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina. O MGIT contém ainda um composto fluorescente sensível à presença de oxigénio dissolvido no caldo. Assim, à medida que as bactérias se multiplicam há consumo de oxigénio e libertação de dióxido de carbono. Deste modo, o fluorocromo deixa de ser inibido e passa a emitir fluorescência<sup>26</sup>.

Os tubos são incubados a 37°C, durante 42 dias, no equipamento BACTED™ MGIT™ 960. São realizadas leituras da fluorescência a cada 60 minutos, e assim que é detetada uma cultura positiva são emitidos sinais luminosos e alarmes sonoros.

#### B) Meio de Lowenstein-Jensen

O meio de Lowenstein-Jensen é um meio de cultura sólido usado para o isolamento de micobactérias. Os tubos são colocados na estufa a 37°C, durante 6 semanas e, é diariamente feita a sua avaliação. As colónias de *M. tuberculosis* apresentam-se como colónias secas e não refringentes e com uma morfologia típica em forma de “couve-flor”<sup>25</sup>.

Caso se detete crescimento bacteriano, no MGIT ou no Lowenstein-Jensen, realiza-se um esfregaço corado pela técnica de Kinyoun e é inoculada uma placa de GS, para confirmar que não se trata do crescimento de um contaminante. Posteriormente procede-se à identificação da micobactéria presente.



#### 6.2.1.4 Identificação

A observação microscópica dos BAAR é muito importante porque revela o seu aspeto morfológico, como em aglomerados, dispersos ou em corda (a partir de material de cultura), e orienta na sua identificação. No laboratório de micobacteriologia do SPS-CHUC, para a sua identificação são utilizados testes moleculares. A Tabela 20 sumaria os testes moleculares de identificação de micobactérias utilizadas no laboratório de micobacteriologia do SPC-CHUC.

**Tabela 20-** Testes moleculares de identificação de micobactérias utilizados no laboratório de micobacteriologia do SPC-CHUC

GenoType Mycobacterium AS	Identificação de micobactérias não tuberculosas a partir de material de cultura.
GenoType Mycobacterium CM	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> , assim como de espécies não tuberculosas a partir de material de cultura.
GenoType MTBDRplus	Identificação do complexo <i>M.tuberculosis</i> e de resistência à rifampicina e isoniazida a partir de material de cultura.
FluoroType MTB	Identificação de <i>M.tuberculosis</i> a partir de amostras diretas dos doentes.

Os testes GenoType baseiam-se na tecnologia DNA-STRIP e o procedimento subdivide-se em três passos: extração do DNA a partir de material de cultura, amplificação por PCR multiplex com primers biotinilados e hibridização reversa. Por fim obtém-se um padrão com bandas na tira específico de cada espécie e que assim permite identificar a espécie presente na amostra<sup>27</sup>. O teste FluoroType MTB difere dos anteriores já que parte de amostras diretas dos doentes e os resultados são positivos ou negativos mediante a fluorescência detetada<sup>28</sup>.

#### 6.2.1.5 TSA

O TSA para *M. tuberculosis* é realizado nos tubos MGIT a partir de culturas de *M. tuberculosis*, em meio líquido ou sólido, e testa a suscetibilidade para os seguintes antibióticos: Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida.

Os tubos MGIT contêm um composto fluorescente sensível à presença de oxigênio dissolvido no meio e, durante a respiração celular, as bactérias consomem o oxigênio do meio, gerando a emissão de fluorescência. Posteriormente, é comparado o crescimento bacteriano dos tubos que contêm cada antibiótico com o tubo controlo, sem antibiótico. Ou seja, é a comparação da fluorescência detetada, resultante do consumo de oxigênio durante a respiração celular, ou ausência de fluorescência, nos tubos com antibióticos com a do tubo controlo que determina os resultados do TSA. Após análise e através de um algoritmo específico, o equipamento liberta os resultados, que são emitidos como sensível (S) ou resistente (R) para cada antibiótico testado<sup>29</sup>.

### 6.3 MICOLOGIA

A Micologia clínica dedica-se ao estudo dos fungos responsáveis por diferentes tipos de infecções humanas, tais como da pele e do sistema respiratório.

Os fungos são microrganismos eucariotas, heterotróficos e a grande maioria aeróbios. A sua parede celular é composta por quitina e a membrana celular contém ergosterol. Os fungos podem crescer sob a forma leveduriforme, filamentosa ou da combinação de ambas as formas<sup>30</sup>.

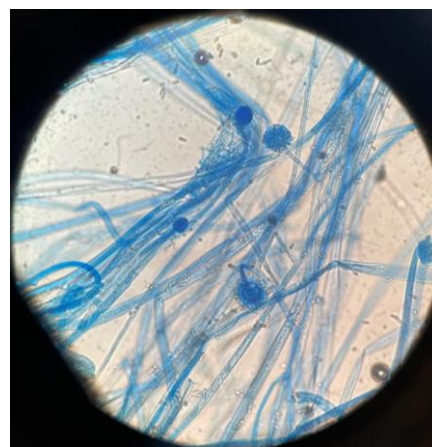
Atualmente, a porção de fungos patogênicos conhecida para o ser humano é pequena, no entanto, tem-se verificado um aumento do número de casos de infecções fúngicas em indivíduos imunocomprometidos (por exemplo, transplantados, com Fibrose Quística ou portadores de VIH).

Ao laboratório de micologia do SPS-CHUC chegam diferentes tipos de amostras, como fragmentos de pele e de unhas, cabelos, sangue, urina, LCR, expetoração, lavados bronco-alveolares, entre outras. No entanto, as amostras ceratinizadas e exteriores, como os fragmentos de pele, unhas e cabelo, são as que representam o maior volume de trabalho.

O exame microscópico direto é de extrema importância uma vez que a observação de elementos fúngicos pode fornecer indicações preciosas para orientar rapidamente a terapêutica. Podem ser observadas preparações a fresco ou após coloração das estruturas fúngicas.

Quanto ao exame cultural, as amostras são inoculadas no meio SGC e colocadas na estufa a 30°C em ambiente húmido (40-50% de humidade relativa). O tempo de incubação varia, porém, as culturas devem ser examinadas diariamente e em média são necessárias quatro semanas para atribuir um resultado definitivo.

Tal como para algumas bactérias, também determinadas leveduras podem ser identificadas através da técnica MALDI-TOF, nomeadamente *Candida* spp.. Por outro lado, nos fungos filamentosos como há uma constante alteração na sua composição proteica ao longo do seu crescimento, torna-se difícil a criação de perfis de identificação através desta técnica. Assim, para a sua caracterização e atribuição de um resultado são avaliadas as características macroscópicas das colónias, como a pigmentação, tipo de micélio e textura, além da sua avaliação microscópica. Para a avaliação microscópica é



**Figura 24-** Fungo filamentosos sugestivo de *Mucor* sp. obtido pela técnica de cultura dilacerada (x40). Fotografia tirada no CHUC durante o estágio.

utilizada a técnica da cultura dilacerada, isto é, corta-se um cubo de gelose mais cultura, deposita-se sobre uma lâmina na qual foi previamente colocada uma gota de azul de lactofenol e observa-se ao microscópio (10x e 40x). É importante analisar a estrutura das hifas e a morfologia dos esporos.

## 6.4 SEROLOGIA

A serologia é a área que tem por base as interações antigénio-anticorpo, permitindo a deteção e a quantificação de anticorpos, assim como a avaliação da evolução da resposta imunológica a infeções. Os anticorpos são produzidos em resposta à exposição ou infeção por agentes infecciosos.

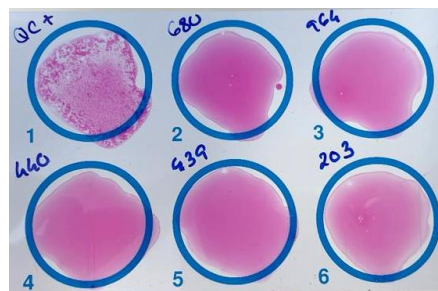
São várias as técnicas utilizadas no laboratório para a deteção de imunoglobulinas, nomeadamente o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Ensaio de Fluorescência Enzimática (ELFA), Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência (CMIA) e Imunofluorescência Indireta (IFI). Além destas, são também realizadas algumas técnicas manuais, no laboratório de serologia do CHUC, nomeadamente:

- **Teste de Rosa de Bengala**

A brucelose é uma zoonose, cujos principais agentes etiológicos são *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* e *Brucella canis*.

O teste de Rosa de Bengala é um teste qualitativo, rápido e sensível que permite detetar a presença de anticorpos específicos de *Brucella* spp. no soro do doente.

Este teste consiste na reação de aglutinação entre a amostra em estudo e uma suspensão tamponada, inativada e corada com Rosa de Bengala de *Brucella* spp.. A positividade de um resultado é atribuída em função da aglutinação observada a olho nu<sup>31</sup>. A Figura 25 apresenta cinco testes negativos (sem aglutinação) de Rosa de Bengala.



**Figura 25-** Cinco testes negativos (sem aglutinação) de Rosa de Bengala. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio

- **Teste não treponémico: *Rapid Plasma Reagin (RPR)***

O RPR consiste num teste de aglutinação em placa que permite detetar a presença de reaginas. A reagina liga-se ao antigénio que é composto por um complexo de partículas de cardiolipina, lecitina e colesterol com carvão ativado. Assim, o resultado desta reação antigénio-anticorpo é revelado por uma observação macroscópica de aglutinação. A positividade é atribuída em função da maior diluição em que esta se verifica<sup>32</sup>.

As amostras positivas devem ser confirmadas por um teste treponémico, como o TPHA.

- ***Treponema pallidum* Hemagglutination Assay (TPHA)**

O TPHA baseia-se numa aglutinação em microplaca, com a formação de um complexo antígeno-anticorpo, de observação macroscópica.

É utilizada uma suspensão de eritrócitos de aves tratados e revestidos com o antígeno purificado de *Treponema pallidum*. Quando no soro do doente existem anticorpos anti-*Treponema pallidum* ocorrerá uma reação de hemaglutinação com os eritrócitos revestidos com o antígeno. Os eritrócitos formam um padrão característico no fundo da cavidade da placa de microdiluição. Na ausência de anticorpos, os eritrócitos formam um botão compacto no fundo da cavidade da placa, enquanto na presença se observa hemaglutinação. A positividade é atribuída em função da maior diluição em que se verifica a hemaglutinação<sup>33</sup>.

O principal produto biológico utilizado neste setor é o soro, podendo também em alguns casos ser utilizado o LCR.

A colheita das amostras deve ser feita na fase aguda da infeção e na fase de convalescença, duas a três semanas depois, para avaliar corretamente a cinética dos anticorpos. E a sua titulação permite detetar e monitorizar doenças infecciosas.

Normalmente a presença de anticorpos IgM é indicativo de uma infeção primária e a presença de anticorpos IgG está associada a situações de infeção passada, podendo em alguns casos conferir imunidade. Quando se deteta a presença simultânea de IgM e IgG é por vezes necessário definir o período de infeção e para isso é realizado o teste da avidéz da IgG. Este teste utiliza um agente desnaturante, como a ureia, para quebrar as ligações antígeno-anticorpo. Assim, quanto maior for a avidéz maior a interação antígeno-anticorpo e por isso, sugere que a infeção é passada e adquirida há mais de quatro meses.

As serologias mais solicitadas no SPC-CHUC são:

- *Treponema pallidum*, a bactéria responsável pela sífilis. Para o diagnóstico desta doença infecciosa segue-se o seguinte algoritmo: realização da sífilis *screening* (pesquisa de anticorpos no soro) por CMIA e no caso de o resultado ser positivo procede-se à titulação por RPR. Quando o RPR é reativo realiza-se o teste treponémico TPHA. Se o TPHA for reativo faz diagnóstico de sífilis. No caso de ser não reativo deve-se repetir o RPR entre duas a três semanas, após a primeira colheita<sup>34</sup>.
- Vírus da Hepatite B, que como o próprio nome indica é o agente etiológico da Hepatite B. Esta patologia pode ser classificada como aguda, quando se detetam antígenos de

superfície (HBsAg). A fase aguda pode ainda ser classificada como replicativa no caso de se detetar o antígeno e (HBeAg). Por outro lado, a Hepatite B pode ser classificada como crónica quando se deteta o HBsAg por um período superior a seis meses, o anticorpo total do core (Anti-HBc total) e o HBeAg ou o anticorpo anti-HBe.

- TORCH (Toxoplasmose, Outras doenças, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes) corresponde ao painel de rastreio serológico de infeções realizado durante a gravidez. Este painel de rastreio é de extrema importância porque estas infeções podem afetar o decurso da gravidez e provocar malformações fetais.

## 6.5 BIOLOGIA MOLECULAR

A deteção e identificação de microrganismos com recurso a técnicas de Biologia Molecular tem sido cada vez maior devido principalmente à sua rapidez de resposta comparativamente às técnicas convencionais utilizadas nos laboratórios de microbiologia.

No CHUC estão disponíveis os GeneXpert® (Cepheid) e o FilmArray® Torch (bioMérieux), que utilizam técnicas de PCR para identificar segmentos genómicos específicos de microrganismos previamente identificados como agentes etiológicos de diferentes infeções.

### 6.5.1 GeneXpert® (Cepheid)

O GeneXpert é um aparelho que utiliza cartuchos que contêm todos os reagentes necessários para a preparação das amostras, a extração e a amplificação de ácidos nucleicos e ainda a deteção da sequência-alvo, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR). Assim como permite detetar genes de resistências<sup>35</sup>.

Alguns dos microrganismos ou toxinas que podem ser identificados com este aparelho são: *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Klebsiella* resistente a carbapenemases (KPC), *Streptococcus agalactiae* (rastreio na gravidez), *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* e a toxina de *Clostridium difficile*.

### 6.5.2 FilmArray® Torch

Neste aparelho são utilizados painéis que permitem a pesquisa de diversos agentes infecciosos (bactérias, fungos, vírus ou parasitas) comumente associados a infeções do trato respiratório (superior e inferior), gastrointestinal, meningites/encefalites e sanguíneas.

O FilmArray utiliza a técnica de PCR multiplex que permite a extração, purificação e amplificação de ácidos nucleicos de diferentes microrganismos presentes na mesma amostra. A reação de PCR multiplex ocorre por duas etapas. A primeira inclui um PCR em tempo real multiplex único e em grande volume, seguindo-se, uma segunda que inclui reações “single-plex”

para detetar os produtos obtidos na primeira etapa. Por fim, o *software* analisa automaticamente os resultados tendo por base o ponto de fusão entre as curvas de *melting* e indica quais os microrganismos detetados e não detetados<sup>36</sup>. A Tabela 21 apresenta os painéis e respetivos exemplos de microrganismos/ toxinas detetados no FilmArray.

**Tabela 21** - Painéis e respetivos exemplos de microrganismos/toxinas detetados no FilmArray® Torch

Painel	Exemplos de microrganismos/ toxinas
<b>Trato respiratório</b>	Adenovírus, Coronavírus, Influenza A e B, Vírus sincicial respiratório, Parainfluenza 1,2,3 e 4, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> e <i>Bordetella</i> spp..
<b>Trato gastrointestinal</b>	Toxina de <i>Clostridium difficile</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> , estirpes de <i>Escherichia coli</i> causadoras de gastroenterites, Adenovírus, Rotavírus, Norovírus, <i>Giardia lamblia</i> e <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>Meningites/ encefalites</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , Citomegalovírus e <i>Cryptococcus neoformans/gatti</i>
<b>Sangue</b>	<i>Candida</i> sp., Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i> sp. e <i>Staphylococcus aureus</i>

## 6.6 CASO CLÍNICO

Indivíduo do sexo masculino, com 71 anos de idade, recorreu ao serviço de urgências do Hospital Universitário de Coimbra por quadro de dor agravado no membro inferior direito, dor lombar e indisposição inespecífica. Mencionou ainda maior cansaço nos últimos 15 dias.

Conheciam-se antecedentes de trombocitopenia prolongada, hiperuricemia, esteatose hepática, hiperplasia benigna da próstata e esplenomegalia. A sua medicação habitual era Prednisolona 20 mg (toma prolongada), Tansulosina 0,4 mg, Alopurinol 300 mg e Tramadol + Paracetamol, 37,5 mg + 325 mg. No SU relatou que vivia com a sua esposa numa moradia com acesso a água canalizada. Tinha uma pequena horta e um galinheiro com patos e galinhas. Referia consumo de ovos caseiros e carne do talho onde trabalhava há 2 anos.

No exame físico demonstrou-se cooperante, consciente e orientado no tempo e no espaço. Os sinais vitais eram os seguintes: pressão arterial de 126/75 mmHg, frequência cardíaca de 107 batimentos por minuto, temperatura de 38,8°C e saturação periférica de oxigénio de 91%. Na auscultação pulmonar verificou-se que estava polipneico e ao exame abdominal, o abdómen estava distendido, mas indolor à apalpação.

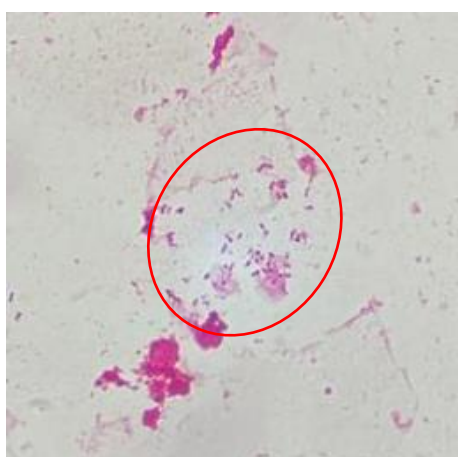
Como exames complementares, solicitou-se uma TAC da coluna lombar que evidenciou fratura da plataforma superior da L4 sem evidências de espondilodiscite. Alguns dos exames laboratoriais solicitados encontram-se representados na Tabela 22.

**Tabela 22-** Estudo analítico do doente à admissão no serviço de urgências

Parâmetro	Resultados	Unidades	Valores de referência
Eritrócitos	4,43	$\times 10^{12}/L$	4,00-5,65
Hemoglobina	12,2	g/dL	11,8-15-8
Leucócitos	4,2	$\times 10^9/L$	3,6-10,5
Neutrófilos	2,84	$\times 10^9/L$	1,50-7,70
Linfócitos	1,15	$\times 10^9/L$	1,10-4,40
Monócitos	0,13	$\times 10^9/L$	0,10-0,90
Eosinófilos	0,01	$\times 10^9/L$	0,02-0,50
Basófilos	0,02	$\times 10^9/L$	0,00-0,20
VS	47	mm/h	1-20
PCR	20,07	mg/dL	<0,5
Procalcitonina	9,61	ng/mL	0-0,5

Pela análise dos resultados, o aumento da PCR e da Procalcitonina sugerem que o doente se encontrava com um quadro de sepsis bacteriano, assim como o aumento da VS, embora inespecífico, estava de acordo com o estado infeccioso apresentado. Deste modo, e associado ao quadro febril, iniciou-se antibioterapia com Ceftriaxone 1g e Vancomicina 20mg/kg.

Solicitou-se uma urocultura e duas hemoculturas. O resultado da urocultura foi negativo, no entanto, as duas hemoculturas foram positivas. Após o resultado positivo prosseguiu-se à realização de um esfregaço sanguíneo, de cada uma das hemoculturas, corado com a coloração de Gram, assim como a cultura em gelose de sangue (GS). Nos esfregaços sanguíneos observaram-se bacilos de Gram-negativos, como está ilustrado na Figura 26. Após reportar esta informação suspendeu-se a Vancomicina 20 mg/kg. Na GS observou-se o crescimento de colónias pequenas, acinzentadas e brilhantes (Figura 27).



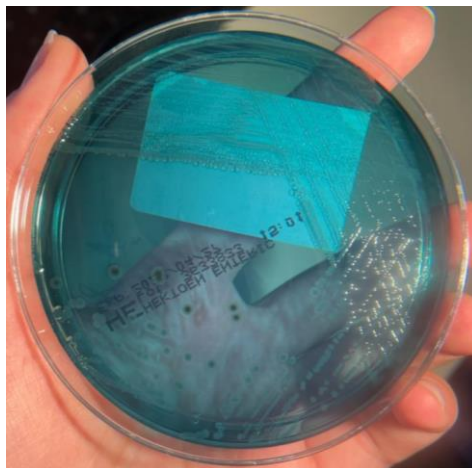
**Figura 26-** Esfregaço sanguíneo da 1ª garrafa de hemocultura corada pela coloração de Gram. No centro da imagem, sinalizado com um círculo vermelho, observam-se bacilos de Gram-negativo ( $\times 90$ ). Fotografia tirada no CHUC durante o estágio



**Figura 27-** Gelose de Sangue com crescimento de colónias pequenas, acinzentadas e brilhantes. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio

A partir de uma colónia isolada da GS realizou-se a identificação, por espectrometria de massa, cujo resultado foi *Salmonella enterica*.

Realizaram-se repicagens para os meios Hecktoen (HE), CLED e Mueller Hinton (MH). Da observação dos meios destacou-se o crescimento bacteriano no meio HE, ilustrado na Figura 28, devido à coloração negra no centro das colónias transparentes que é característico de *Salmonella* spp..



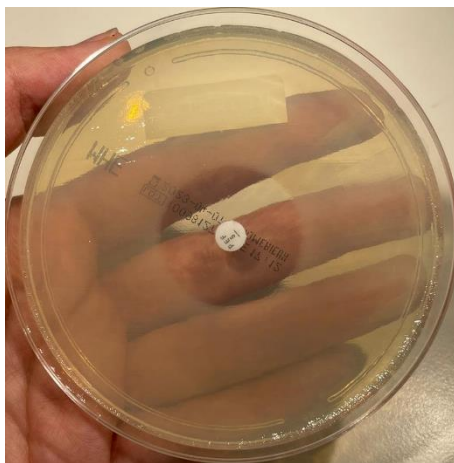
**Figura 26-** Meio Hecktoen com crescimento de colónias pequenas, translúcidas e com centro negro sugestivas de *Salmonella* spp. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio

A partir de colónias isoladas do meio MH efetuou-se uma serotipagem manual, um teste de aglutinação em lâmina, para identificar o serogrupo bacteriano. Esta identificação baseia-se nas diferenças nos antígenos somáticos O de superfície presentes nas espécies de *Salmonella*, que são depois diferenciados em serovares, por uma serotipagem adicional, por identificação do antígeno flagelar H. Nesta técnica, em cada lâmina, misturam-se colónias bacterianas e anti-soros polivalentes, seguindo-se com anti-soros monovalentes específicos, e a positividade de um resultado é atribuída em função da aglutinação observada. Verificou-se aglutinação com o anti-soro polivalente OMB e com o anti-soro monovalente O:6,7. Isto significa que a bactéria expressa os epítomos O:6,7 e constitui o serogrupo CI. Observou-se também aglutinação com o anti-soro polivalente HMA, pelo que se deveria testar os anti-soros monovalentes H a; c; d; l e z10, no entanto, foram testados apenas os a; d e l, uma vez que o laboratório não disponha dos restantes, e, não se observou aglutinação com nenhum dos testados. Também se verificou se expressava o antígeno capsular Vi porque o serovar Paratyphi C, pertencente ao serogrupo CI, expressa, mas não se verificou aglutinação.

De seguida realizou-se um Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA) manual com um disco de 5 µg de Pefloxacina, uma vez que segundo as regras de EUCAST, discos de 5 µg de Ciprofloxacina não detetam baixas resistências de algumas serovariedades de



*Salmonella enterica*. O resultado é apresentado na Figura 29. Como o diâmetro do halo de inibição medido foi superior a 24 mm (32 mm) concluiu-se que a estirpe era sensível à Pefloxacina e, por isso, também à Ciprofloxacina.



**Figura 27-** TSA manual para testar a suscetibilidades da bactéria em estudo a Ciprofloxacina. Fotografia tirada no CHUC durante o estágio

Além do TSA manual, também se realizou o TSA automatizado e o resultado obtido foi:

- **Sensível:** Cefotaxima, Ciprofloxacina, Trimetoprim/Sulfa e Piperacilina/Tazobactam
- **Resistente:** Ampicilina e Amoxiciclina/Ácido clavulânico

Após reportar os resultados do TSA automatizado alterou-se a antibioterapia para Ciprofloxacina.

Conclui-se que o paciente se encontrava com um quadro de sepsis por *Salmonella enterica* pertencente ao grupo CI.

A sepsis corresponde a uma infecção generalizada, e segundo o *Centers for Disease Control and Prevention*, a maioria surge a partir de infecções pulmonares, do trato urinário ou gastrointestinal. Neste caso, o ponto de partida era desconhecido, porém poderá ter-se desenvolvido na sequência de uma infecção gastrointestinal adquirida após o consumo de ovos ou carne contaminados. É ainda de salientar a corticoterapia crónica, a toma de analgésicos e imunossuppressores e a idade do doente, uma vez que terão contribuído para o enfraquecimento do sistema imunológico e conseqüentemente para a evolução sistémica. Além de que este quadro se desenvolveu na sequência de uma infecção por *Salmonella* não typhi, que habitualmente não desencadeia infecções invasivas.

## 7. BIOQUÍMICA

A bioquímica corresponde ao ramo da biologia que se dedica ao estudo das reações químicas a nível molecular e celular que ocorrem nos seres vivos. É fundamental na prática clínica uma vez que através de parâmetros bioquímicos determinados permite diagnosticar, tratar, monitorizar ou prevenir doenças.

No setor de bioquímica do SPC-CHUC são efetuadas análises em amostras de sangue (sangue total e soro), urina, LCR e fezes. No entanto, a amostra biológica de eleição é o soro, seguindo-se a urina.

Relativamente à análise bioquímica da urina esta permite o doseamento de determinados parâmetros que permitem avaliar a função renal. É feita a sumária de urina (urina tipo II) que inclui a identificação de características físicas, a cor e a aparência (por exemplo, presença de espuma) e a avaliação bioquímica que compreende os seguintes parâmetros: densidade, pH, leucócitos, nitritos, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e hemoglobina. Frequentemente é também avaliado o sedimento urinário por fotometria de refletância para observação e contagem de elementos celulares, cristais e cilindros. A Tabela 23 apresenta os parâmetros analisados no setor de Bioquímica.

**Tabela 23-** Parâmetros analisados no setor de Bioquímica

<b>Parâmetros analisados</b>	
<b>Perfil lipídico</b>	Colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL e Triglicérides
<b>Perfil glicémico</b>	Glucose e Hemoglobina glicada
<b>Função Hepato-Biliar</b>	Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Gama-glutamil transferase (GGT) e Bilirrubina
<b>Função Renal</b>	Azoto ureico, Creatinina, Ácido úrico, Proteínas totais, Albumina e Osmolalidade
<b>Função gastrointestinal e pancreática</b>	Alfa-amilase e Lipase
<b>Ionograma</b>	Sódio, Potássio e Cloro
<b>Metabolismo mineral</b>	Cálcio, Magnésio e Fosforo
<b>Estudo do Ferro</b>	Ferro sérico, Ferritina, Saturação da transferrina, Capacidade total de fixação do ferro
<b>Marcadores de infeção/inflamação</b>	Proteína C reativa e Procalcitonina
<b>Marcadores cardíacos</b>	NT-proBNP e Troponina I
<b>Marcadores de lesão celular</b>	Creatina cinase (CK) e Lactato desidrogenase (LDH)
<b>Bioquímica urinária</b>	Densidade, pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e hemoglobina



## **8. CONCLUSÃO**

Este relatório reflete o trabalho exigente, mas enriquecedor desenvolvido ao longo do Mestrado em Análises Clínicas. A realização do estágio curricular foi de extrema importância para a minha formação acadêmica e profissional, assim como para o meu crescimento pessoal. Adquiri muitos conhecimentos novos e apliquei no contexto prático laboratorial muitos dos adquiridos ao longo deste mestrado.

Esta experiência permitiu-me ter uma visão global da rotina laboratorial num contexto real de trabalho num centro hospitalar de prestígio como é o CHUC. Foi um privilégio estagiar no SPC-CHUC que recebe uma enorme variedade de amostras e de trabalhar com uma equipa variada de profissionais de saúde. Percebi na prática que a comunicação e as boas relações interpessoais são imprescindíveis para o bom funcionamento de todo o laboratório.

Concluindo, penso que os objetivos propostos para o estágio foram atingidos, uma vez que saí com uma visão mais crítica, que me faz questionar os resultados, correlacionando as diferentes áreas.



## 9. BIBLIOGRAFIA

1. IZHAR, Shabnam; CHUPHAL, D. S.; JOSHI, B. C. - Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) – dependent pseudothrombocytopenia: a case report. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 8:10 (2014) 3-4. [Consult. 11 jan. 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253181/pdf/jcdr-8-FL03.pdf>
2. SILVA, Paulo [et al.] - **Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2016. [Consult. 17 fev. 2023]. ISBN 978-85-8271-260-3.
3. HOFFBRAND, Victor; MOSS, Paul - **Hoffbrand's essential haematology**. 7.a ed. UK: John Wiley & Sons Ltd, 2016. [Consult. 17 fev. 2023]. ISBN 978-1-118-40867-4(pbk.).
4. **SEED Haematology - The red blood cell indices**. [Consult. 11 jan. 2023]. Disponível em: [https://www.sysmex.es/fileadmin/media/fl00/Academy/Documents/SEED/Sysmex\\_SEED\\_The\\_Red\\_Blood\\_Cell\\_Indices.pdf](https://www.sysmex.es/fileadmin/media/fl00/Academy/Documents/SEED/Sysmex_SEED_The_Red_Blood_Cell_Indices.pdf)
5. **Método de deteção SLS**. [Consult. 11 jan. 2023]. Disponível em: <https://www.sysmex.es/es-pt/academia/centro-de-conhecimento/tecnologia/metodo-de-detecao-sls.html>
6. GUALANDRO, Sandra F. M. - Análise do exame hematológico - alterações dos eritrócitos. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. [Consult. 16 jul. 2023]. ISBN 978-85-388-0454-3. p. 833-840.
7. RODAK, Bernardette F.; CARR, Jacqueline H. - **Clinical hematology atlas**. 5.a ed. Missouri: Elsevier, 2017. [Consult. 11 jan. 2023]. ISBN 978-0-323-32249-2.
8. **Analysis principles training workbook xn-series**. 3.a ed. UK: Sysmex House, 2022. 48 p.
9. Diagnostics for white blood cell abnormalities - leukocytosis and leukopenia. **Physician Assistant Clinics**. 4:3 (2019) 625-635. [Consult. 9 fev. 2023]. Disponível em: [https://physicianassistant.theclinics.com/article/S2405-7991\(19\)30028-3/fulltext](https://physicianassistant.theclinics.com/article/S2405-7991(19)30028-3/fulltext)
10. ERKURT, Mehmet A. [et al.] - Thrombocytopenia in adults: review article. **Journal of Hematology and Elmer Press**. (2012) 44-53. [Consult. 19 fev. 2023]. Disponível em: <https://www.thejh.org/index.php/jh/article/view/28>
11. BAIN, Barbara J. - **Blood cells - a practical guide**. 5.a ed. UK: Wiley Blackwell, 2015. 504 p.
12. SILVERTHORN, Dee U. - **Fisiologia humana - uma abordagem integrada**. 7.a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 963 p. ISBN 9780321981226.
13. BONAR, Roslyn A.; LIPPI, Giuseppe; FAVALORO, Emmanuel J. - Overview of hemostasis and thrombosis and contribution of laboratory testing to diagnosis and management of

- hemostasis and thrombosis disorders. **Hemostasis and thrombosis - methods and protocols**. New York: Humana Press, 2017. vol. 1646. [Consult. 3 mar. 2023], p. 3-27. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_1). ISBN 978-1-4939-7196-1.
14. ANTOVIC, Jovan P.; BLOMBACK, Margareta - **Essential guide to blood coagulation**. UK: Blackwell, 2010. [Consult. 1 fev. 2023]. ISBN 978-1-4051-9627-7.
  15. KARAPETIAN, Hratch - Reptilase time (RT). **Haemostasis**. Totowa: Humana Press, 2013. vol. 992. [Consult. 20 mar. 2023], p. 273-277. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8_20) ISBN 978-1-62703-339-8.
  16. WARKENTIN, T. [et al.] - Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia: a conceptual framework and implications for diagnosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 9 (2011) 2498-2500. [Consult. 20 mar. 2023]. Disponível em: [https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836\(22\)07484-0/fulltext](https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836(22)07484-0/fulltext)
  17. NEWALL, Fiona - Anti -factor Xa (Anti-Xa) Assay. **Haemostasis: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2013. vol. 992. p. 265-272.
  18. CROCHEMORE, Tomaz [et al.] - A new era of thromboelastometry. **Einstein**. 15:3 (2017) 380-385. [Consult. 22 mar. 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5823059/>
  19. FONSECA, Ana B. [et al.] - **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. Lisboa: Programa Nacional de Controlo da Infecção; Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde, 2004. 193 p.
  20. DINGLE, Tanis C.; BUTLER-WU, Susan M. - MALDI-TOF Mass Spectrometry for microorganism identification. **Clinics in Laboratory Medicine**. 33:3 (2013) 589-609. [Consult. 13 abr. 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>
  21. SMITH, David A.; NEHRING, Sara M. - Bacteremia. **StatPearls**. UK: Treasure Island (FL) - StatPearls Publishing, 2022. [Consult. 5 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441979/>
  22. THORPE, Thurman C. [et al.] - BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. **Journal of clinical microbiology**. 28:7 (1990) 1608-1612.
  23. MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Medical microbiology**. 8.<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. 932 p. ISBN 978-0-323-29956-5.
  24. LEBER, Amy L. - Volume I. **Clinical microbiology procedures handbook**. 4.a ed. Columbus: ASM Press, 2016. vol. I. 2946 p. ISBN 9781555818814.
  25. BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - Volume I. **Microbiologia médica**. Lidel, 2014. vol. I. 544 p. ISBN 9789897520570.

26. **BBL™ MGIT™ AST SIRE system for the antimycobacterial susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis.** 2019. [Consult. 7 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=21311>
27. **GenoType mycobacterium cm.** 2014. [Consult. 7 jul. 2023]. Disponível em: [https://www.hainlifescience.de/include\\_datei/kundenmodule/packungsbeilage/download.php?id=776](https://www.hainlifescience.de/include_datei/kundenmodule/packungsbeilage/download.php?id=776)
28. **FluoroType MTB 1.0 and fluorotype MTB 2.0.** [Consult. 7 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/fluorotype-mtb.html>
29. **BD BACTEC™ MGIT™ 960 e 320 Sistema Completo para Micobactérias.** [Consult. 7 jul. 2023] Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/microbiology-testing/bactec-mgit-960-and-320>
30. Mycology. BARON, S., ed. - **Medical microbiology.** 4.a ed. Galveston: University of texas medical branch at galveston, 1996. [Consult. 13 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8147/>
31. DÍAZ, Ramón [et al.] - The rose bengal test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** 5:4 (2011) 1-7. [Consult. 9 jul. 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000950>
32. PORTNOY, Joseph; BREWER, John H.; HARRIS, Ad - Rapid plasma reagin card test for syphilis and other treponematoses. **Public Health Reports.** 77:8 (1962) 645-652. [Consult. 12 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1915003/pdf/pubhealthreporig00092-0005.pdf>
33. GARNER, M. [et al.] - The Treponema pallidum haemagglutination (TPHA) test in biological false positive and leprosy sera. **Journal of Clinical Pathology.** 26 (1973) 258-260. [Consult. 12 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC477701/pdf/jclinpath00114-0016.pdf>
34. SORENG, Katherine; LEVY, Roma; FAKILE, Yetunde - Serologic testing for syphilis: benefits and challenges of a reverse algorithm. **Clinical microbiology newsletter.** 36:24 (2014) 195-202. [Consult. 12 jul. 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2014.12.001>
35. SASIKUMAR, Chinnu [et al.] - The role of GeneXpert in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. **Via medica Journals.** ISSN 2451-4934. 88 (2019) 184-188. [Consult. 13 jul. 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.5603/ARM.2020.0102>
36. PORITZ, Mark A. [et al.] - FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract



infection. **PLOS ONE**. 6:10 (2011) 1-14. [Consult. 13 jul. 2023]. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026047>

## 10. ANEXOS

### Anexo I - Metodologias/canais usados para determinação dos parâmetros do eritrograma

**Técnica de impedância com focagem hidrodinâmica:** as amostras começam por ser diluídas numa solução isotónica e, depois, as células são encaminhadas através de uma abertura na qual existem dois eléctrodos de cargas opostas. Por meio da focagem hidrodinâmica, as células passam uma a uma na abertura e desta passagem resulta uma mudança na resistência eléctrica que é proporcional ao tamanho de cada célula. Os impulsos eléctricos gerados são depois convertidos num histograma<sup>4</sup>.

**Método Lauril Sulfato de Sódio:** após a lise dos eritrócitos, pelo Sulfolyser, há adição do reagente LSS que provoca alteração conformacional da molécula de globina. Consequentemente há exposição do grupo heme e oxidação do ião ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Os grupos hidrofílicos da molécula de LSS ligam-se ao  $\text{Fe}^{3+}$ , formando um produto que pode ser analisado fotometricamente a 555 nm. A proporção de luz absorvida por este produto é proporcional à concentração de Hb da amostra<sup>5</sup>.

**Canal RET:** é usado um reagente lisante que inicialmente perfura as membranas celulares deixando as células intactas. Numa segunda etapa, os ácidos nucleicos são marcados com polimetina e o sinal emitido é diretamente proporcional à quantidade de ácidos nucleicos. Os reticulócitos emitem um maior sinal de fluorescência que os eritrócitos, que não têm RNA, e consideravelmente inferior ao sinal dos leucócitos.

### Anexo 2 - Metodologias/canais usados para a contagem diferencial dos leucócitos

**Canal WDF:** há adição de um surfactante que provoca lise dos eritrócitos e altera a permeabilidade da membrana plasmática dos leucócitos, permitindo que os ácidos nucleicos sejam marcados com corantes fluorescentes específicos, como a polimetina. As células são analisadas por citometria de fluxo por fluorescência, recorrendo a detetores de dispersão frontal/lateral e fluorescência lateral. Depois, estas passam alinhadas através de um laser semiconductor provocando dispersão da luz. A medição da intensidade da luz dispersa frontalmente fornece informação quanto ao volume celular. A medição da intensidade da luz dispersa lateralmente permite avaliar o conteúdo celular, tendo por base a granularidade e lobulação. Já a intensidade de fluorescência lateral é diretamente proporcional à quantidade de DNA/RNA presente na célula<sup>8</sup>.

**Canal WNR:** há adição de um reagente que lisa a membrana dos eritrócitos e reduz os eritroblastos, assim como os leucócitos, com exceção dos basófilos que ficam intactos, praticamente aos respetivos núcleos. De seguida é adicionado um corante fluorescente, que

tem afinidade para o núcleo e grânulos conferindo-lhes cor, e assim permite a distinção tendo por base o tamanho e intensidade da fluorescência das diferentes células<sup>8</sup>.

### **Anexo 3 – Método de contagem plaquetar por fluorescência**

**Método de contagem por fluorescência:** é usado um corante específico, a oxazina, que cora o RNA ribossomal, do retículo endoplasmático rugoso, e o DNA mitocondrial. Assim, as plaquetas recém-libertadas são mais reativas e por isso são mais fluorescentes<sup>2</sup>.