

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas: importância do diagnóstico hematológico e molecular**

Silvana Dantas da Silva Agra

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Isabel Cristina Gomes Falcão de Bettencourt Moreira da Silva e coorientado pela Dra. Sofia Amorim Alves Botelho Moniz

**Mestrado em Análises Clínicas**

**2024**

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas: importância do diagnóstico hematológico e molecular**

Silvana Dantas da Silva Agra

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Isabel Cristina Gomes Falcão de Bettencourt Moreira da Silva e coorientado pela Dra. Sofia Amorim Alves Botelho Moniz

**Mestrado em Análises Clínicas**

**2024**

# Agradecimentos

À minha família pelo apoio em todos os momentos da minha vida, em especial à minha irmã Silvia Carvalho por ser o meu espelho na vida e ao meu esposo Diego Bemquerer Castro por ser sempre o meu suporte.

À Dra. Sofia Moniz, Dra. Benvinda Barbosa e ao Dr. Rui Campainha por tornarem real a hipótese de realizar o estágio no laboratório UNILABS Porto.

À Dra. Filipa Paramés, Dra. Teresa Paramés e à Dra. Magda Leitão por sempre consolidarem as minhas aprendizagens ao longo do mestrado e me chamarem para ver cada lâmina ou caso mais interessante que com qual se deparavam no laboratório Imunolab e UNILABS.

A cada técnico dos setores em que realizei o estágio, que me cederam o seu tempo para ensinar sobre as suas atividades diárias, com menção especial à Clara do Céu Correia, Rute Areal e Dra. Andrea Maria Afonso. Agradeço ainda aos coordenadores das áreas que me permitiram ir mais além do que meramente acompanhar a execução das atividades, mas também aprendê-las e executá-las, em especial a Dra. Alice Barros Cortez, Dra. Cristina Isabel Silva e Dra. Rita Cerqueira. Agradeço ainda, à minha colega de estágio Nádía Araújo, que tornou toda a experiência de ir ao Porto e realizar o estágio muito mais prazerosa.

Agradeço à Prof. Dra. Isabel Bettencourt Moreira da Silva por ter sido uma professora especialmente memorável desde o momento em que tive o primeiro contato com ela na disciplina de Hematologia, mas, mais que isso, ter demonstrado ser sempre uma profissional excelente e genuinamente preocupada com o interesse do aluno na aprendizagem. Além disso, demonstrou ser uma pessoa muito querida durante todo o processo de escrita do presente trabalho e sempre se manteve disponível e disposta a colaborar com a profissional que aqui se formava.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial o Glauber Lopes e a Margarida Fernandes, que, em conjunto, montamos uma rede de apoio mútuo que possibilitou avançar nesse trajeto.

## **Declaração de Integridade**

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referenciação das frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Este trabalho foi elaborado de acordo com o disposto no Artigo 40.º do Regulamento Geral do Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, n.º 999/2021, DR, 2.ª série – N.º 236, de 7 de dezembro de 2021.

## Resumo

Este trabalho de final de curso encontra-se dividido em duas partes: relatório de estágio e monografia. A primeira parte trata-se do relatório de estágio curricular realizado no Laboratório de Análises Clínicas UNILABS nas valências laboratoriais de Microbiologia, Bioquímica e Genética. A segunda parte trata-se de uma revisão da literatura sobre o tema “Neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas: importância do diagnóstico hematológico e molecular”.

As neoplasias mieloproliferativas são um grupo heterogêneo de doenças que têm origem numa célula progenitora hematopoiética multipotente em que ocorre proliferação clonal da linhagem mieloide sem displasia significativa e com tendência para hematopoiese extramedular, fibrose e transformação leucémica. De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde - WHO, as neoplasias mieloproliferativas englobam as seguintes doenças: Leucemia mieloide crónica, Policitemia vera, Trombocitose essencial, Mielofibrose primária, Leucemia neutrofílica crónica, Leucemia eosinofílica crónica, Leucemia mielomonocítica juvenil e Neoplasias mieloproliferativas sem outras especificações. Encontram-se divididas em dois grupos: as *BCR::ABL1* positivas, em que se insere a Leucemia mieloide crónica, e as *BCR::ABL1* negativas que incluem as demais neoplasias mieloproliferativas.

O diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas é realizado de acordo com as diretrizes da WHO que englobam avaliações das características clínicas e laboratoriais, com ênfase nos resultados do hemograma, análises bioquímicas, mielograma, biópsia de medula óssea e exames genéticos. Este diagnóstico é de extrema importância e tem um impacto direto no prognóstico e tratamento destes pacientes, bem como no seu acompanhamento, pois podem surgir complicações e uma potencial evolução para uma Leucemia mieloide aguda.

A segunda parte deste trabalho, referente à monografia, pretende rever e seleccionar as informações mais relevantes sobre o tema, discorrendo sobre a evolução dos critérios de classificação da WHO e como foram atualizados ao longo dos anos. Enfatiza, ainda, os métodos laboratoriais e, principalmente, os métodos moleculares de diagnóstico aplicados às doenças mieloproliferativas. Métodos estes que vêm, cada vez mais, sendo uma ferramenta importante para o diagnóstico correto e atempado das doenças mieloproliferativas.

**Palavras-chave:** Neoplasias mieloproliferativas; Diagnóstico hematológico; Diagnóstico molecular.

# Abstract

This final course assignment is divided into two parts: the internship report and a monograph. The first part consists of the internship report carried out at the UNILABS Clinical Analysis Laboratory in the laboratory fields of Microbiology, Biochemistry, and Genetics. While the second part consists of a literature review on the topic " *BCR::ABL1* negative myeloproliferative neoplasms: importance of hematologic and molecular diagnosis".

Myeloproliferative neoplasms are a heterogeneous group of diseases originated from a multipotent hematopoietic progenitor cell in which it occurs clonal proliferation of the myeloid lineage without significant dysplasia and with a tendency for extramedullary hematopoiesis, fibrosis, and leukemic transformation. According to the World Health Organization - WHO criteria, myeloproliferative neoplasms include Chronic Myeloid Leukemia, Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, Primary Myelofibrosis, Chronic Neutrophilic Leukemia, Chronic Eosinophilic Leukemia, Juvenile Myelomonocytic Leukemia, and unspecified myeloproliferative neoplasms. They are divided into two groups: *BCR::ABL1* positive, including Chronic Myeloid Leukemia, and *BCR::ABL1* negative, including the other myeloproliferative neoplasms.

Diagnosis of myeloproliferative neoplasms are made according to World Health Organization guidelines, which involve clinical assessments and laboratorial analysis comprised of complete blood count, biochemical analyses, bone marrow examination, and genetic tests. Diagnosing myeloproliferative neoplasms is very important in treatment of patients since it allows for close monitoring of complications and potential progression to Acute Myeloid Leukemia.

The second part of this assignment, which is the monograph, aims to review relevant information on the topic, discussing the evolution of World Health Organization classification criteria over the years and how they were updated. Also emphasizes the laboratory methods of analysis, with particular emphasis to the molecular diagnostic methods applied to myeloproliferative disorders, which is proving to serve as an important tool for accurate early diagnosis.

**Keywords:** Myeloproliferative neoplasms; Hematological diagnostics; Molecular diagnostics.

# Índice

<b><u>PRIMEIRA PARTE – RELATÓRIO DE ESTÁGIO</u></b> .....	<b>23</b>
<b><u>1 INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>24</b>
<b><u>2 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO</u></b> .....	<b>25</b>
<b><u>3 FASE PRÉ-ANALÍTICA</u></b> .....	<b>27</b>
<b><u>4 FASE ANALÍTICA</u></b> .....	<b>30</b>
<b>4.1 SETOR DE MICROBIOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
4.1.1 URINAS .....	33
4.1.1.1 Exame cultural .....	34
A. Técnicas de Coloração de Gram.....	36
4.1.1.2 Urinas tipo II .....	37
4.1.1.3 Urinas contagem minutada .....	39
4.1.1.4 Pesquisa de Micobactérias na urina.....	40
A. Técnicas de Coloração .....	40
B. Cultura para Micobactérias .....	41
4.1.1.5 Pesquisa de <i>Trichomonas vaginalis</i> na urina.....	42
4.1.1.6 Pesquisa de Ureaplasma e Mycoplasma na urina .....	42
4.1.1.7 Pesquisa de Antígenos urinários de <i>Legionella</i> spp. ....	43
4.1.1.8 Pesquisa de Antígenos urinário de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	43
4.1.1.9 Pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> na urina .....	44
4.1.2 TRATO GÊNITO-URINÁRIO .....	44
A. Exame Direto.....	45
B. Pesquisa de <i>Trichomonas vaginalis</i> . ....	45
C. Pesquisa de Ureaplasma e Mycoplasma.....	45
4.1.2.1 Exsudado Uretral.....	45
A. Exame Cultural.....	46
4.1.2.2 Exsudado Vaginal.....	46

A. Exame Cultural.....	47
4.1.2.3 Esperma.....	47
A. Exame Cultural.....	47
4.1.2.4 Pesquisa de Streptococcus do Grupo B .....	48
A. Exame Cultural.....	48
4.1.3 EXSUDADO CONJUNTIVAL/OFTÁLMICO.....	48
A. Exame Direto.....	49
B. Exame Cultural.....	49
4.1.4 TRACTO RESPIRATÓRIO SUPERIOR.....	50
A. Exame Direto.....	50
4.1.4.1 Exsudado Orofaringeo/ amigdalino .....	50
A. Exame Cultural.....	50
B. Prova de Bacitracina .....	51
C. Pesquisa de Strepto A .....	51
4.1.4.2 Exsudado Nasal/ Nasofaríngeo.....	51
A. Exame Cultural.....	52
B. Pesquisa de MRSA .....	52
C. Pesquisa de Influenza.....	52
D. Pesquisa de RSV.....	53
E. Pesquisa de Adenovirus .....	53
4.1.4.3 Exsudado do Ouvido/ Auricular.....	53
A. Exame Cultural.....	54
4.1.5 TRACTO RESPIRATÓRIO INFERIOR.....	54
A. Exame Direto.....	54
B. Exame Cultural.....	55
4.1.6 PELE, TECIDOS MOLES E OSSOS .....	55
A. Exame Direto.....	55
4.1.6.1 Feridas Superficiais.....	56
A. Exame Cultural.....	56
4.1.6.2 Feridas Profundas .....	56
A. Exame Cultural.....	56
4.1.7 SANGUE.....	57
4.1.7.1 Hemoculturas .....	58
A. Exame Direto.....	59
B. Exame Cultural.....	59

4.1.7.2	Ponta de cateter .....	59
A.	Exame Cultural.....	59
4.1.8	LÍQUIDOS DAS CAVIDADES NATURAIS.....	59
A.	Exame Direto.....	60
B.	Pesquisa de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	60
C.	Exame cultural.....	60
4.1.9	FEZES .....	61
A.	Exame Cultural.....	61
B.	Pesquisa de Parasitas .....	62
C.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	62
D.	Pesquisa de <i>Clostridioides difficile</i> .....	63
E.	Pesquisa de Crypto e Giardia .....	64
F.	Pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i> .....	64
G.	Pesquisa de Rotavírus.....	64
H.	Pesquisa de Adenovírus.....	65
I.	Pesquisa de Astrovírus.....	65
J.	Pesquisa de Norovírus .....	65
4.1.10	ZARAGATOIA RETAL.....	66
A.	Pesquisa de ESBL.....	66
B.	Pesquisa de Carbapenemases.....	67
4.1.11	PELE, CABELO E UNHAS .....	67
A.	Exame Direto.....	68
B.	Exame cultural.....	68
4.1.12	IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	69
4.1.13	TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	71
<b>4.2</b>	<b>SETOR DE BIOQUÍMICA.....</b>	<b>75</b>
4.2.1	ATELLICA SOLUTION .....	76
4.2.1.1	Metabolismo dos Glúcidos .....	78
A.	Glicose.....	78
B.	Prova de tolerância oral à glicose- PTGO.....	79
C.	Insulina .....	79
D.	Péptido C .....	80
E.	Interpretação.....	80
4.2.1.2	Metabolismo dos lípidos .....	82
A.	Colesterol Total .....	82

B. Colesterol LDL.....	82
C. Colesterol HDL.....	83
D. Triglicéridos .....	84
E. Interpretação.....	85
4.2.1.3 Metabolismo das Proteínas.....	86
A. Proteínas Totais - Soro .....	86
B. Proteínas Totais – Outros fluidos biológicos .....	86
C. Albumina .....	87
D. Proteína C reativa.....	87
E. Interpretação.....	88
4.2.1.4 Avaliação da Função Hepática.....	89
A. Bilirrubina Total, Direta e indireta .....	89
B. Fosfatase Alcalina .....	90
C. Gama-Glutamil Transferase.....	90
D. Transaminases.....	91
E. Interpretação.....	91
4.2.1.5 Avaliação da Função Renal .....	92
A. Ureia .....	93
B. Creatinina.....	93
C. Clearance da Creatinina .....	94
D. Ácido Úrico .....	94
E. Microalbuminúria.....	95
F. Interpretação.....	95
4.2.1.6 Avaliação do Equilíbrio Ácido Base .....	96
A. Eletrólitos .....	96
B. Interpretação .....	97
4.2.1.7 Avaliação da Função Pancreática.....	97
A. Amilase pancreática.....	98
B. Lipase.....	98
C. Interpretação .....	99
4.2.1.8 Marcadores de Lesão Muscular .....	99
A. Creatina-cinase .....	99
B. Lactato Desidrogenase.....	100
C. Interpretação .....	100
4.2.1.9 Avaliação da Função Cardíaca .....	100

A. CK-MB.....	101
B. Troponina I.....	101
C. Mioglobina.....	102
D. Interpretação.....	102
4.2.1.10 Metabolismo do Ferro.....	103
A. Ferro.....	103
B. Transferrina.....	103
C. Capacidade total de fixação do ferro.....	104
D. Ferritina.....	104
E. Interpretação.....	105
4.2.1.11 Metabolismo Mineral e Ósseo.....	105
A. Cálcio.....	106
B. Paratormona.....	106
C. Vitamina D.....	107
D. Fósforo.....	107
E. Magnésio.....	108
F. Interpretação.....	108
4.2.2 RAPID-POINT 500.....	109
4.2.2.1 Gasimetria.....	109
4.2.3 PREMIER HB9210.....	112
4.2.3.1 Hemoglobina glicada.....	112
4.2.4 CAPILLARYS 2.....	113
4.2.4.1 Eletroforese de proteínas.....	113
4.2.5 SPECTRUM TWO.....	115
4.2.5.1 Análise de Cristais.....	115
4.2.6 PLASMAQUANT MS.....	115
4.2.6.1 Análise de Metais.....	115
<b>4.3 SETOR DE GENÉTICA.....</b>	<b>117</b>
4.3.1 DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL – DPN.....	117
4.3.1.1 Rastreio Pré-Natal.....	118
4.3.1.2 Teste Pré-Natal não invasivo.....	119
4.3.1.3 Teste Pré Natal invasivo.....	119
4.3.2 CITOGENÉTICA.....	120
4.3.2.1 Cariótipo.....	120
4.3.2.2 FISH.....	122

4.3.2.3	MLPA.....	124
4.3.2.4	ARRAY.....	125
4.3.3	ANÁLISE DE FRAGMENTOS.....	126
4.3.3.1	Extração de DNA.....	126
4.3.3.2	PCR.....	127
<b>5</b>	<b><u>CONTROLO DE QUALIDADE .....</u></b>	<b>129</b>
5.1	CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO.....	129
5.2	AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....	130
<b>6</b>	<b><u>FASE PÓS-ANALÍTICA.....</u></b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b><u>CONCLUSÕES.....</u></b>	<b>132</b>
<b><u>SEGUNDA PARTE – MONOGRAFIA.....</u></b>		<b>133</b>
<b>1</b>	<b><u>INTRODUÇÃO.....</u></b>	<b>134</b>
<b>2</b>	<b><u>OBJETIVOS.....</u></b>	<b>135</b>
<b>3</b>	<b><u>NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS .....</u></b>	<b>136</b>
3.1	NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	136
3.2	DISTÚRBIOS GENÉTICOS DAS NMP .....	137
3.2.1	GENE <i>BCR::ABL</i> .....	138
3.2.2	MUTAÇÕES NO GENE <i>JAK2</i> .....	138
3.2.2.1	A mutação V617F.....	140
3.2.2.2	Mutações no exão 12.....	141
3.2.3	MUTAÇÕES NO GENE <i>CALR</i> .....	141
3.2.4	MUTAÇÕES NO GENE <i>MPL</i> .....	143
3.2.5	OUTRAS MUTAÇÕES NAS NMP .....	144
3.3	CLASSIFICAÇÃO DAS NMP .....	145
3.4	EPIDEMIOLOGIA DAS NMP.....	146
<b>4</b>	<b><u>NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS <i>BCR::ABL1</i> NEGATIVAS .....</u></b>	<b>148</b>

4.1	POLICITEMIA VERA .....	148
4.2	TROMBOCITEMIA ESSENCIAL .....	149
4.3	MIELOFIBROSE PRIMÁRIA .....	150
4.4	LEUCEMIA NEUTROFÍLICA CRÓNICA .....	151
4.5	LEUCEMIA EOSINOFÍLICA CRÓNICA .....	151
4.6	LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL.....	152
4.7	NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS SEM OUTRAS ESPECIFICAÇÕES .....	153
<b>5</b>	<b><u>DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....</u></b>	<b>154</b>
5.1	DIAGNÓSTICO HEMATOLÓGICO.....	155
5.1.1	HEMOGRAMA.....	155
5.1.2	MIELOGRAMA .....	158
5.2	DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	162
5.2.1	PCR ALELO ESPECÍFICO (ASO-PCR).....	163
5.2.2	PCR EM TEMPO REAL (QPCR).....	164
5.2.3	SEQUENCIAÇÃO DE SANGER.....	165
5.2.4	NGS ( <i>NEXT GENERATION SEQUENCING</i> ).....	166
5.2.5	CARIÓTIPO DE BANDAS G .....	168
5.2.6	FISH .....	169
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSÕES.....</u></b>	<b>171</b>
<b>7</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</u></b>	<b>172</b>

## Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Processos do Laboratório UNILABS. [Adaptado de (5)]</i> .....	27
<i>Figura 2 – Sementeira quantitativa. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	34
<i>Figura 3 – Sementeira por esgotamento em quatro quadrantes [Silvana Agra; 2023]</i> .....	35
<i>Figura 4 – Coloração de bactérias de Gram negativo (esquerda) e coloração de bactérias de Gram positivo (direita). [Silvana Agra; 2023]</i> .....	36
<i>Figura 5 – Equipamento Série-UN - Sysmex. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	38
<i>Figura 6 – Coloração de micobactérias. [Adaptado de (19)]</i> .....	40
<i>Figura 7 – Teste IST 3 para Ureaplasma e Mycoplasma [Silvana Agra; 2023]</i> .....	43
<i>Figura 8 – Equipamento Bact/ALERT® [Silvana Agra; 2023]</i> .....	58
<i>Figura 9 – Pesquisa de C. difficile [Silvana Agra; 2023]</i> .....	63
<i>Figura 10 – Equipamento Microflex - Bruker. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	69
<i>Figura 11 – Equipamento Vitek 2 – Biomerieux. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	70
<i>Figura 12 - Equipamento MicroScan WalkAway - Beckman Coulter. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	72
<i>Figura 13 - Equipamento AutoMate 2550 - Beckman Coulter. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	75
<i>Figura 14 - Equipamento Atellica Solution 1600(Siemens Healthineers) [Silvana Agra; 2023]</i> .....	76
<i>Figura 15 - Equipamento de gasimetria RapidPoint 500 (Siemens) [Silvana Agra; 2023]</i> .....	111
<i>Figura 16 - Equipamento Premier Hb9210 - Menarini Diagnostics. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	112
<i>Figura 17 - Equipamento Capillarys Sebia 2 [Silvana Agra; 2023]</i> .....	113
<i>Figura 18 -Equipamento Spectrum Two – PerkinElmer. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	115
<i>Figura 19 - Equipamento Plasma Quant MS - AnalytikJena [Silvana Agra; 2023]</i> .....	116
<i>Figura 20 - Equipamento AutoDelfia - PerkinElmer. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	118
<i>Figura 21 - Lâmina de Cariótipo para avaliação da qualidade das metáfases. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	121
<i>Figura 22 - Processo de montagem de Cariótipo. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	122
<i>Figura 23 - Imagem de FISH em análise. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	123
<i>Figura 24 - Imagem de Array CGH em análise. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	126
<i>Figura 25 - Visualização dos fragmentos em eletroforese. [Silvana Agra; 2023]</i> .....	128
<i>Figura 26 - Esquema da hematopoiese. [Adaptado de (209)]</i> .....	136
<i>Figura 27- Esquema das Neoplasias Mieloproliferativas. [Adaptado de (211)]</i> .....	137
<i>Figura 28 - Representação da translocação do gene BCR::ABL1 [Adaptado de (214)]</i> .....	138
<i>Figura 29 - Domínios das JAKs [Adaptado de (217)]</i> .....	139
<i>Figura 30 - Via de sinalização JAK-STAT nas NMP. [Adaptado de (219)]</i> .....	139
<i>Figura 31 - Mutação V617F no gene JAK2. [Adaptado de (222)]</i> .....	140
<i>Figura 32 - Mutações no exão 12 do gene JAK2. [Adaptado de (224)]</i> .....	141
<i>Figura 33 - Domínios da Calreticulina [Adaptado de (228)]</i> .....	142
<i>Figura 34 - Ativação da via JAK2-STAT pela proteína CALR mutante. [Adaptado de (230)]</i> .....	142
<i>Figura 35 – Ativação da via JAK2-STAT pela proteína MPL mutante. [Adaptado de (231)]</i> .....	143

<i>Figura 36 - Algoritmo de diagnóstico das NMP BCR::ABL1 negativas. PV- Policitemia Vera; TE- Trombocitemia essencial; MFP- Mielofibrose primária [Adaptado de (260)].</i>	154
<i>Figura 37 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de PV. [Adaptado de (267,268)]</i>	159
<i>Figura 38 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de TE. [Adaptado de (268)]</i>	159
<i>Figura 39 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de MFP. [Adaptado de (268)]</i>	160
<i>Figura 40 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de LNC. [Adaptado de (269,270)]</i>	160
<i>Figura 41- Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de LNE. [Adaptado de (271,272)]</i>	161
<i>Figura 42 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de LMMJ. [Adaptado de (266,273)]</i>	161
<i>Figura 43 – Mutação JAK2 V617F detetada por ASO-PCR num caso de PV. [Adaptado de (280)] M-marcador de pesos moleculares; 1 - resultado positivo para a mutação JAK2 V617F; 2 - resultado negativo; 3 - controlo positivo para a mutação JAK2 V617F; 4 - controlo negativo do PCR.</i>	164
<i>Figura 44 - Detecção da mutação JAK2 V617F por qPCR. [Retirado de (282)]</i>	164
<i>Figura 45 - Detecção da mutação JAK2 por sequenciação de Sanger. [Adaptado de (284)]</i>	165
<i>Figura 46 - Detecção de mutações no gene CALR por sequenciação de Sanger. [Adaptado de (285)]</i>	166
<i>Figura 47 - Detecção da mutação W515L no gene MPL por sequenciação de Sanger. [Adaptado de (286)]</i>	166
<i>Figura 48 - Cariótipo com a presença do cromossoma Philadelphia - t(9;22)(q34;q11). Os cromossomas 9 e 22 estão assinalados com setas vermelhas. [Retirado de (274)]</i>	168
<i>Figura 49 - Cariótipo 46,XX,del(20),(q13.1). A seta assinala a deleção. [Retirado de (289)]</i>	169
<i>Figura 50 – Identificação da deleção 20q (cor vermelha) por FISH. [Adaptado de (290)].</i>	170

## Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 – Condições das amostras de microbiologia. [Adaptado de (7)]</i> .....	31
<i>Tabela 2 — Resultado expresso para micobactérias. [Adaptado de (20)]</i> .....	41
<i>Tabela 3 - Mutações envolvidas nas NMP. [Retirado de (233)]</i> .....	144
<i>Tabela 4 - Dados epidemiológicos das NMP. [Adaptado de (243,244,245,246)]</i> .....	147
<i>Tabela 5 - Critérios de diagnóstico da PV. [Adaptado de (207,254)]</i> .....	148
<i>Tabela 6 - Critérios de diagnóstico da TE. [Adaptado de (207,254)]</i> .....	149
<i>Tabela 7 - Critérios de diagnóstico da MFP. [Adaptado de (207,254)]</i> .....	150
<i>Tabela 8 - Critérios de diagnóstico da LNC. [Adaptado de (207,257)]</i> .....	151
<i>Tabela 9 - Critérios de diagnóstico da LEC. [Adaptado de (207,257)]</i> .....	152
<i>Tabela 10 - Critérios de diagnóstico da LMMJ. [Adaptado de (207,254)]</i> .....	152
<i>Tabela 11- Valores do hemograma de um caso de PV. [Retirado de (261)]</i> .....	155
<i>Tabela 12- Valores do hemograma de um caso de TE. [Adaptado de (262)]</i> .....	156
<i>Tabela 13-Valores do hemograma de um caso de MFP. [Adaptado de (263)]</i> .....	157
<i>Tabela 14-Valores do hemograma de um caso de LNC. [Adaptado de (264)]</i> .....	157
<i>Tabela 15 - Hemograma de um caso de LEC. [Adaptado de (265)]</i> .....	158
<i>Tabela 16 - Hemograma de um caso de LMMJ. [Adaptado de (266)]</i> .....	158
<i>Tabela 17- Métodos de deteção da mutação JAK2 V617F. [Retirado de (256)]</i> .....	162
<i>Tabela 18- Mutações detetadas por NGS num caso de TE. [Retirado de (286)]</i> .....	167

# Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

°C - Graus Celsius

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$\gamma$  - Gama

mL - Mililitro

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{L}$  - Microlitro

ADP - Difosfato de adenosina

AE - Éster de acridínio

ALT - Alanina-aminotransferase

AMP - 2-amino-2-metil-1-propanol

Apo A - Apolipoproteína A

Apo B - Apolipoproteína B

ARA - Aplicação de Receção e Atendimento

ARCA - Área de Receção e Controlo de Amostras

ASO - PCR - *Polymerase Chain Reaction*

AST - Aspartato-aminotransferase

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Trifosfato de adenosina

BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes

BCG - Solução verde de bromocresol

BHCG - Gonadotrofina coriónica humana

CALR - Calreticulina

CGC - Centro de Genética Clínica

CGH - *Comparative genomic hybridization* (Hibridização genómica comparativa)

CH - *Atellica Chemistry Analyzer*

ChAS - *Chromosome Analysis Suite*

CHCA - Ácido-ciano-4-hidroxicinâmico

CK-BB - Creatina-cinase originária do cérebro

CK-MB - Creatina-cinase originária do miocárdio

CK-MM - Creatina-cinase originária do músculo esquelético

CLED - *Cystine Lactose Electrolyte Deficient*

CLIA - *Clinical Laboratory Improvement Amendments*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute Inc.*

CNVs - Variações no número de cópias

CPK - Creatina-fosfoquinase

CPM - Colites pseudomembranosas

C<sub>s</sub> - Clearance da creatinina

CSF - *Colony-stimulating factors* (Fatores estimuladores de colónias)

DPN - Diagnóstico Pré Natal

DSBmT - Disulfobutilmetatoluidina sódica

ESBL - *Extended spectrum beta-lactamases* ( $\beta$ -lactamases de espectro alargado)

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAL- Fosfatase alcalina

FISH - *Fluorescent In Situ Hybridization*

FTIR - Espectroscopia do infravermelho com Transformada de Fourier

GBS - *Streptococcus* do grupo B

GDH - Glutamato desidrogenase

GenQA - *Genomics Quality Assessment*

GGT - Gama-Glutamil transferase

Hb - Hemoglobina

HGPT - Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase

HPV - Vírus papiloma humano

HSV - Herpes simplex vírus

Ht - Hematócrito

ICP-MS - Espectrometria de massa por plasma individualmente acoplado

IDL - Lipoproteína de densidade intermédia

IL - Interleucinas

IM - *Atellica Immunoassay Analyzer*

IMT - Integrated Multisensor Technology (Tecnologia de Multisensores Integrados)

ISCN - Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana

ISE - Eléctrodos Selectivos de Iões

KDEL - Sequencia de aminoácidos: K-Lisina, D-Aspartato, E-Glutamato e L-Leucina

*KPC - Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LDH - Lipoproteína de alta densidade

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LEC - Leucemia eosinofílica crónica

LMA - Leucemia mieloide aguda

LMC - Leucemia mieloide crónica

LMMJ - Leucemia mielomonocítica crónica juvenil

LNC - Leucemia neutrofílica crónica

LOH - *Loss of heterozygosity* (Perda de heterozigotia)

Lpa - Lipoproteína a

MALDI - Ionização/ dessorção a laser assistida por matriz

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*

MFP - Mielofibrose primária

Min - Minutos

MLPA - *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

MoM - Múltiplo da mediana

MPL - *Myeloproliferative leukemia virus oncogene*

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

MS - Espectrometria de massa

NAD - Nicotinamida adenina dinucleótido

NAD<sup>+</sup> - Dinucleótido de adenina nicotinamida oxidado

NADH - Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido

NALC - N-acetil-L-cisteína

NEQAS - *National External Quality Assessment Scheme*

NGS - *Next Generation Sequencing*

NHS - N- éster hidroxisuccinimidil

NIPT - *Noninvasive prenatal testing* (Teste Pré-Natal não invasivo)

NMP - Neoplasias mieloproliferativas

NPCR - *Prevention's National Program of Cancer Registries*

OF - Ordem dos Farmacêuticos

PAPP-A - Proteína plasmática associada à gravidez

PCR - Proteína C reativa

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PCR-RT - PCR em tempo real

PDCA - *Plan-Do-Check-Act*

Ph - Cromossoma Philadelphia

PI3K - *Fosfatidil-Inositol Quinase 3*

PMPs - Partículas paramagnéticas

p-NP - p-nitrofenol

p-NPP - p-nitrofenilfosfato

P<sub>s</sub> - Creatinina no sangue

PTGO - Prova de tolerância oral a glicose

PTH - Paratormona

PV - Policitemia Vera

Q - Quilomícrons

RIQAS - *Randox International Quality Assessment Sample*

RLU - Unidades de luz relativa

R.P.M. - Rotações por minuto

RSV - Vírus sincicial respiratório

SCORE - *Systemic Coronary Risk Estimation*

SEER - *Surveillance, Epidemiology and End Results*

SH - *Atellica Sample Handler*

SL - Sulfato laurel de sódio

SNC - Sistema nervosa central

STAT - *Signal transducers and activators of transcription*

TA - Temperatura ambiente

TE - Trombocitemia essencial

TIBC - Capacidade total de fixação do ferro sérico

TOF - Tempo de voo

TOOS - N-etil-N-(2- hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina

TPO - Trombopoietina

TSA - Teste de suscetibilidade antimicrobiana

UFC - Unidade Formadora de Colónias

U<sub>s</sub> - Creatinina na urina

V - Fluxo urinário em mL/min

VLDL- *Very Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de muito baixa densidade)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

# **PRIMEIRA PARTE – RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

# 1 Introdução

O estágio curricular foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas UNILABS da cidade do Porto sob a orientação da Dra. Sofia Amorim Alves Botelho Moniz, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pela ordem dos Farmacêuticos O.F. - Nº 12652.

O estágio visou aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso de mestrado. Nesse tópico, a experiência de estágio num laboratório de grande dimensão como o Unilabs apresentou uma abordagem altamente automatizada dos processos estudados ao longo do curso. Com rotinas bem estabelecidas e com rastreabilidade dos processos presentes no laboratório, as descrições desses procedimentos nesse relatório, muitas vezes, trazem a mesma apresentação sistemática que foi encontrada no decorrer do estágio.

O estágio foi realizado de segunda a sexta-feira das 08:00 às 17:00. Foram realizadas 225 horas no setor de microbiologia do dia 01/03/2023 ao dia 07/04/2023; 265 horas no setor de bioquímica do dia 17/04/23 ao dia 02/06/23; e 260 horas em genética do dia 12/06/23 ao dia 28/07/23, com um quantitativo final de 750 horas.

A respeito da experiência no setor de Microbiologia, é interessante notar que é um setor um pouco diferente dos outros, no sentido em que há mais intervenção manual, ainda que mantendo o rigor procedimental em cada etapa. Como tal, há muitas etapas manuais para se alcançar os resultados das análises.

No setor de bioquímica, a automação dos processos é notável e há pouca interferência do técnico no processo de análise em si. Entretanto, como consequência, aumenta a relevância da garantia da confiabilidade do equipamento e seus controlos e a interpretação por parte do técnico dos resultados obtidos.

Já no setor de genética, ficou clara a complexidade da área e o quanto, comparativamente aos outros setores, seus procedimentos estão em constante revisão e aprimoramento, devido ao próprio desenvolvimento do campo. Por esse motivo, a experiência de estágio foi valiosa no sentido de possibilitar o contacto com uma área inovadora.

Sendo assim, a apresentação neste relatório dos tópicos vistos em estágio visa descrever os procedimentos das técnicas vivenciadas.

## 2 Caracterização do local de estágio

O Grupo UNILABS foi fundado em 1987 e atualmente está presente em 15 países distribuídos por 4 continentes, com sua sede na Suíça. É um dos principais laboratórios de diagnóstico médico da Europa, com prestação de serviço na área laboratorial, de patologia e imagiologia. (1,2)

A rede de laboratórios da UNILABS em Portugal é constituída por mais de mil unidades com atendimento nas especialidades de Análises Clínicas, Anatomia Patológica, Cardiologia, Gastrenterologia, Genética Médica, Medicina Nuclear e Radiologia. (1,2)

O Laboratório de Análises Clínicas UNILABS Porto é a sede do grupo UNILABS em Portugal e está localizado na rua Manuel Pinto de Azevedo n.º 173, 4100-321, com horário de funcionamento para os utentes de segunda a sexta das 07:30 às 18:30, aos sábados das 08:00 às 13:00 e aos domingos encontra-se fechado. Entretanto, o setor técnico do laboratório funciona 24 horas por dia e todos os dias da semana. (3)

O laboratório implementa um sistema de gestão da qualidade para a melhoria contínua, em cumprimento da norma NP EN ISO 9001:2015, sendo acreditado pela NP EN ISO 15189:2014 e o setor de genética é acrescido ainda da certificação CLIA. (4)

Os laboratórios da rede UNILABS utilizam o sistema informático ARA, um sistema integrado de atendimento, registo de pacientes e atos médicos, que inclui um historial com os episódios de análises clínicas. O sistema Ara é dotado com a capacidade de identificar corretamente os utentes e associar a novos episódios de análises. Para além disso, também calcula e fatura taxas moderadoras e copagamentos e identifica corretamente todas as amostras biológicas, minimizando erros processuais. (5)

O programa ARA integra os dados do utente e das análises que o utente irá realizar com o programa Clinidata, que é um sistema de gestão de laboratório. É neste programa que é realizado o controlo da entrada das amostras, a introdução de resultados manuais, a consulta por parte dos equipamentos sobre quais análises vão ser realizadas em cada tubo, o recebimento dos resultados dos equipamentos, a validação técnica e a validação biopatológica. (5)

A gestão da qualidade utiliza o programa *Unity* e o site *Caresphere* para a monitorização dos controlos de qualidade internos. E utiliza o programa *InnovWay* QMS para a consulta de documentos como manuais, bulas e procedimentos, além de ser uma forma de controlar manutenções preventivas, manutenções corretivas e resultados das avaliações externas da qualidade.

O laboratório possui um Manual de Segurança e Saúde do Trabalho que contempla regras de segurança a fim de minimizar os riscos inerentes ao trabalho em cada secção do laboratório, bem como medidas preventivas em casos de acidentes. Contém ainda informações sobre: boas práticas laboratoriais; higiene e organização; medicina do trabalho; uso dos equipamentos de proteção individual de uso obrigatório; instruções sobre manuseio de gases e reagentes químicos; descarte consciente de resíduos; e procedimentos de emergência. (6)

Diante do exposto, o Laboratório UNILABS apresenta-se com um excelente ambiente de aprendizagem e aperfeiçoamento profissional.

### 3 Fase Pré-analítica

Os processos no laboratório (Figura 1) podem ser divididos em 3 fases diferentes: a fase pré-analítica, a fase analítica e a fase pós-analítica. A fase pré-analítica compreende: a receção dos pacientes para registo da sua identificação; registo das análises solicitadas pelos médicos; cumprimento das preparações para tais análises; colheita do material biológico; processamento inicial das amostras (centrifugação ou congelamento); transporte das amostras; e triagem e armazenamento no laboratório. (5)

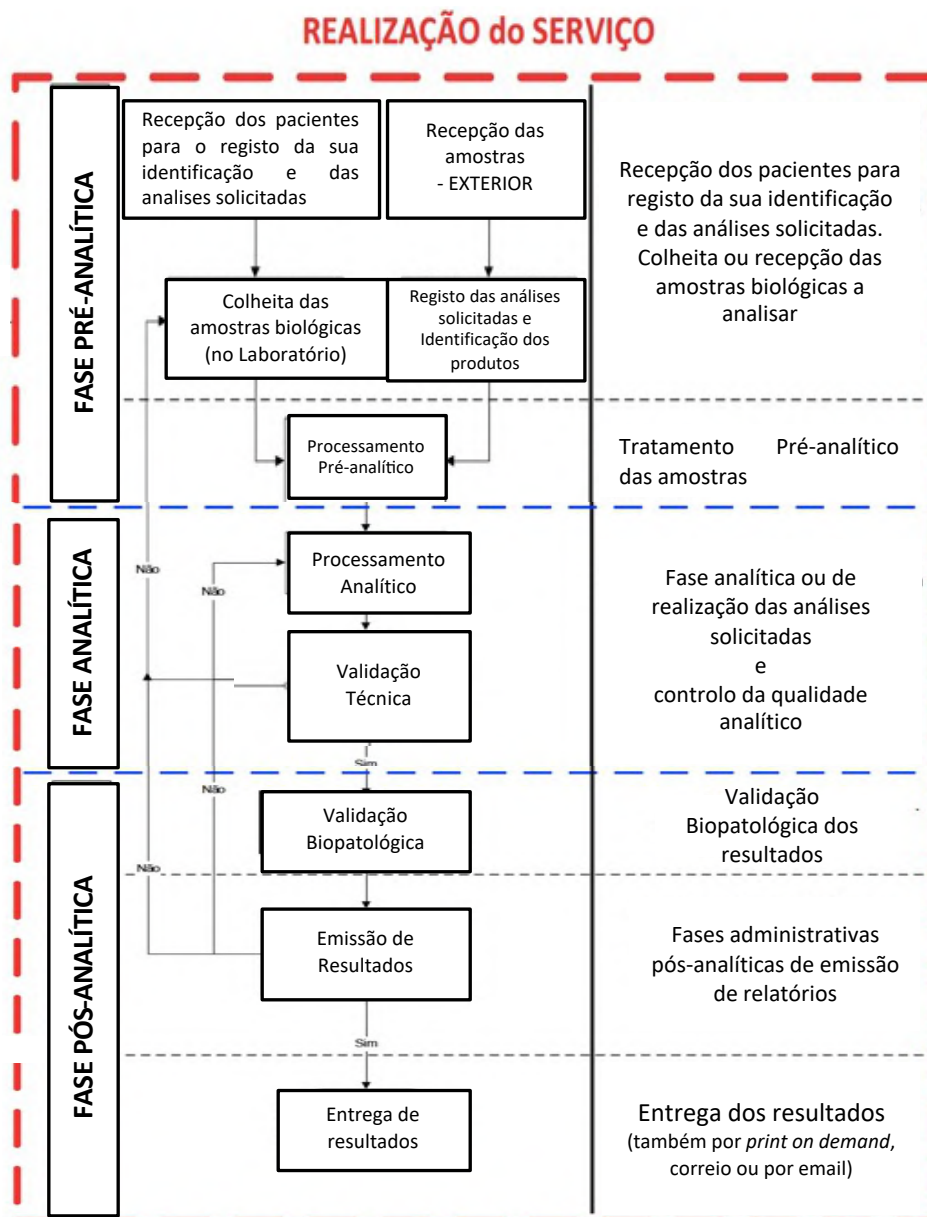


Figura 1 - Processos do Laboratório UNILABS. [Adaptado de (5)]

Para controlo desta fase do processo, o laboratório possui diversos documentos instruindo sobre cada procedimento a ser realizado. Como, por exemplo, o Manual de Colheitas, o Manual de Colheitas de Microbiologia, Manual de Colheitas de amostras de Genética, Manual de Colheitas de Anatomia Patológica, o Procedimento de Cuidados Especiais de amostras, e diversas instruções para pacientes e para procedimentos realizados na hora da colheita. (5)

Os manuais contemplam informações sobre todos os aspetos da análise. São alguns deles: método da técnica; a necessidade de preparação do paciente; tipos de amostras aceitáveis; recipiente de colheita; volume mínimo; cuidado especial necessário; preparação da amostra; tempo de estabilidade; temperatura de transporte e condições de rejeição da amostra. (5)

O laboratório possui ainda indicadores com a finalidade de garantir a qualidade na fase pré- analítica. Esses indicadores apontam motivos de pedidos de novas colheitas, para evitar que as etapas futuras do processo não sejam comprometidas. (5)

Na área anterior à triagem, os motoristas depositam as malas onde o técnico da triagem as abre. O técnico retira as amostras e coloca em estantes separadas por categorias de acordo com o tipo de amostra. As malas possuem uma monitorização de temperatura informatizado, chamado de sistema Vigie, que monitoriza as temperaturas durante todo o transporte das amostras e gera notificações em sistema quando os limites são extrapolados.

O laboratório possui duas áreas de triagem: uma área de triagem de tubos de sangue e outra área de triagem de urina, fezes e outros produtos. As amostras são descarregadas on-line para a dependência do laboratório que vai realizar as análises.

É nesta etapa que são verificados os critérios de rejeição de amostra. Dentre os principais critérios de inaceitabilidade da amostra estão:

1. Tubo/contentor sem identificação ou com identificação ilegível;
2. Discordância entre as identificações apostas no tubo/contentor e na requisição associada;
3. Tubo/contentor vazio ou com volume manifestamente insuficiente;
4. Tubo/contentor em desacordo com o definido no manual de colheitas;
5. Tubo/contentor vertido, partido ou contaminado externamente por amostra biológica;
6. Amostra de soro/plasma não cumprindo as normas de separação/conservação definidos no manual de colheitas. Incluindo a conservação nas condições de temperatura exigidas par a determinação em causa;
7. Amostras em anticoagulante coaguladas devem ser entregues sob reserva ao sector técnico o qual avalia das possíveis interferências;
8. Amostras de soro ou plasma de citrato com hemólise visível devem ser entregues sob reserva ao sector técnico o qual avalia das possíveis interferências;

9. Tubos de soro recebidos sem centrifugação deve ser avaliado os resultados para decidir sobre pedido de nova colheita. (5)

Após receberem a preparação inicial, as amostras são distribuídas para as áreas de destino onde serão analisadas. Cada setor tria as amostras para confirmar o recebimento no sistema Clinidata. O setor de microbiologia e genética possuem uma distribuição manual das amostras para a técnica que deve ser executada enquanto o setor de bioquímica possui uma distribuição automática.

## 4 Fase Analítica

A fase analítica compreende a porção de efetiva realização das análises. Nesta fase estão abrangidos: os equipamentos que são utilizados; os softwares dos equipamentos; os técnicos que manuseiam os equipamentos; os reagentes que são utilizados; os controlos internos, calibrações e manutenções preventivas que garantem a boa funcionalidade do equipamento; e outros consumíveis que são necessários para a realização dos exames laboratoriais e a geração do seu resultado.

O laboratório UNILABS encontra-se dividido nas seguintes áreas analíticas: hematologia, microbiologia, core(bioquímica), análises especiais, biologia molecular, genética, imunohemoterapia, anatomia patológica e gestão da qualidade. Serão descritos, a seguir, os setores em que foi realizado o estágio. (5)

### 4.1 Setor de Microbiologia

O corpo humano possui uma vasta microbiota. Porém alguns microrganismos são considerados patogênicos e causam doenças ao hospedeiro. Por esse motivo, é muito importante detetar com precisão a presença de patógenos. O laboratório de microbiologia cumpre com essa função.

O isolamento e identificação de microrganismos no setor de microbiologia é um processo minucioso, pois requer a obtenção de uma amostra representativa do local da infecção, livre de contaminação de outras áreas, e em tempo útil para não se perder a viabilidade bacteriana.

O isolamento do patógeno inicia-se antes mesmo da colheita do material biológico, pois é necessário que sejam realizadas colheitas antes da antibioterapia. No isolamento, é necessário que sejam utilizadas técnicas e meios específicos para os patógenos de interesse se desenvolverem. E no relatório final é importante que sejam evidenciados microrganismos potencialmente patogênicos e que o antibiograma seja de acordo com o comportamento da bactéria face à sua exposição ao antibiótico.

No laboratório UNILABS, o setor de microbiologia engloba o estudo das bactérias, fungos, parasitas e micobactérias. Para melhor compreensão de como estes microrganismos são estudados, a secção foi subdivida de acordo com os diferentes tipos de amostras que são recebidas no setor.

Inicialmente todas as amostras passam pelo setor de triagem e depois são encaminhadas ao setor de microbiologia, onde são tratadas de acordo com seu tipo e devem

cumprir com os requisitos descritos na tabela 1. Caso contrário, são consideradas amostras não conformes e não seguem para o setor de microbiologia, gerando assim a necessidade de uma nova colheita.

**Tabela 1 – Condições das amostras de microbiologia. [Adaptado de (7)]**

<b>Amostra</b>	<b>Recipiente</b>	<b>Volume Mínimo</b>	<b>Transporte</b>	<b>Conservação</b>
<b>Urina</b>	Frasco Estéril	10-20 ml	≤ 2h - 4°C	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Exsudado Uretral</b>	Zaragatoa fina com meio de transporte Amies Líquido	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - TA
<b>Exsudado Vaginal</b>	Zaragatoa com meio de transporte Amies Líquido	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - TA
<b>Esperma</b>	Frasco Estéril	10-20 mL	≤ 2h - TA	>2 ≤ 24h - TA
<b>Exsudado Orofaringeo/amigdalino</b>	Zaragatoa fina com meio de transporte Amies Líquido	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Exsudado Nasofaríngeo</b>	Zaragatoa fina com meio de transporte Amies Líquido	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Exsudado Nasal</b>	Zaragatoa fina com meio de transporte Amies Líquido	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Exsudado do Ouvido/Auricular</b>	Zaragatoa fina com meio de transporte Amies Líquido	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Expetoração</b>	Frasco estéril	3-5mL	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Aspirado Brônquico, lavado broncoalveolar, Escovado brônquico e punção aspirativa transtorácica</b>	Frasco estéril ou Recipiente coletor do sistema	3-5mL	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C

**Tabela 1 (continuação) – Condições das amostras de microbiologia. [Adaptado de (7)]**

<b>Peles e tecidos moles: Feridas, Abscessos, celulite, úlceras de pressão e queimadura</b>	Frasco estéril ou Seringa com obturador de borracha	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Ossos e articulações: Tecido ósseo, aspirado líquido articular e material de prótese</b>	Frasco estéril	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Exsudado conjuntival</b>	Frasco estéril	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Sangue</b>	Frasco de hemocultura	10 mL em Adultos	≤2h - TA	Estufa 35-37 °C
<b>Ponta de Cateter</b>	Frasco estéril	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Líquidos: Pericárdico, pleural, peritoneal/ascítico, articular/sinovial</b>	Frasco estéril ou	10 mL	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
	Frasco de hemocultura	10 mL em Adultos	≤2h - TA	Estufa 35-37 °C
<b>LCR</b>	Frasco estéril	1 a 2 mL	≤2h - TA	>2 ≤ 24h – Estufa 35-37 °C
<b>Fezes (para bacteriologia)</b>	Frasco estéril	Fezes moldadas: 3g  Fezes Líquidas: 5-10 mL	≤2h - TA	TA
<b>Zaragatoa retal</b>	Zaragatoa fina com meio de transporte Amies líquido	N/A	≤2h - TA	>2 ≤ 24h - 4 °C
<b>Pele, unhas e cabelo</b>	Frasco estéril ou Placa de Petri	N/A	TA	TA

Após a chegada da amostra no setor de microbiologia, os materiais avançam para a realização de sementeiras, realização de lâminas e exame a fresco. Após o tempo de incubação, as placas são verificadas e destinadas à identificação e à realização do teste de suscetibilidade antimicrobiano (TSA). Depois de obtidos os resultados, o especialista avalia os resultados e faz a validação técnica dos mesmos.

Na secção seguinte, serão descritos os procedimentos de processamento de cada tipo de material biológico.

#### 4.1.1 Urinas

O exame da urina é subdividido em três partes: o exame físico; o exame químico; e o exame microscópico do sedimento urinário. O exame físico engloba a inspeção do aspeto da urina, sua cor e a sua densidade. O exame químico engloba a medição de pH, proteínas, glicose, urobilinogénio, bilirrubina, nitritos, hemoglobina e esterase leucocitária. E o exame microscópico do sedimento urinário permite a visualização das células epiteliais, eritrócitos, leucócitos e outros elementos celulares como fungos, cilindros e as bactérias. (8)

Os exames físico e químico da urina são uma ferramenta importante para avaliar a função do sistema renal como um todo, auxiliando no diagnóstico de glomerulonefrite, nefropatias e cálculos renais. Já o exame microscópico do sedimento urinário auxilia principalmente na pesquisa de patógenos para elucidação de doenças infecciosas. (8)

Os tipos de patógenos pesquisados podem ser bactérias de Gram negativas como as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. Podem ainda ser bactérias de Gram positivas como os *Staphylococcus saprophyticus* e os *Enterococcus* spp. E outros como o *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, fungos como a *Candida albicans*, micobactérias como o *Mycobacterium tuberculosis*, e parasitas como *Trichomonas vaginalis*. (8)

A análise da urina inicia-se com a cultura da urina para o cultivo de microrganismos. Após semeada, a urina segue para a realização da análise da urina do tipo II que auxilia na interpretação da quantificação do crescimento bacteriano. A pedido médico, realizam-se pesquisas específicas para o que foi solicitado, como: a pesquisa de parasitas como *Trichomonas vaginalis*; a cultura para fungos, como a pesquisa de *Candida albicans*; a cultura para micobactérias, como a pesquisa para *Mycobacterium tuberculosis*; e pesquisas direcionada a bactérias específicas como o *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*.

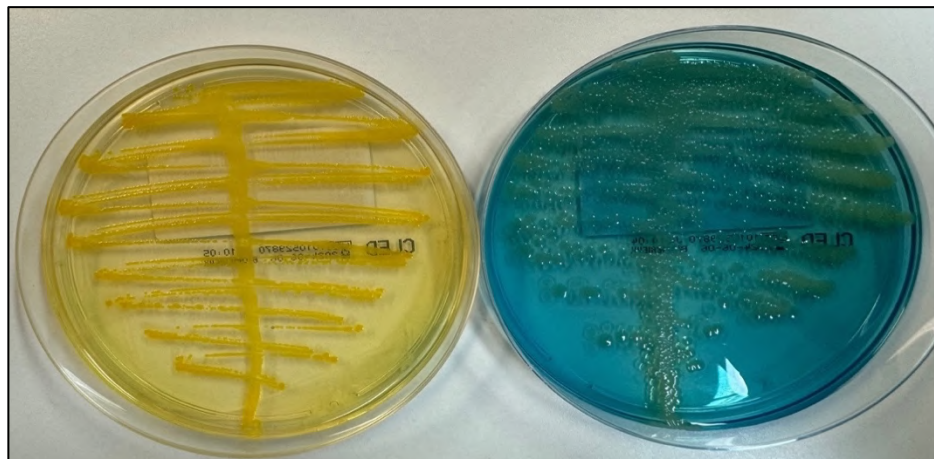
No laboratório UNILABS, inicialmente as urinas são triadas nos próprios postos de colheita, onde, ao são triadas e passadas do tubo primário para o tubo de triagem. O sistema gera as etiquetas de acordo com a quantidade de análises que serão realizadas, por isso, o número de tubos deve corresponder com o número de análises que serão realizadas. Quando chegam à triagem do laboratório, as amostras são separadas em *racks* pelo tipo de análise.

#### 4.1.1.1 Exame cultural

Dentro das análises que auxiliam o estudo das doenças infecciosas, o exame cultural de urina é realizado para elucidação de suspeitas de infecção bacteriana do trato urinário; para controlo de tratamento; e em pacientes assintomáticos com alto risco de infeção. (8)

A cultura de urina é realizada em gelose CLED (*Cystine Lactose Electrolyte Deficient*), que permite diferenciar as bactérias que fermentam a lactose das que não fermentam, graças ao indicador azul de bromotimol. As bactérias lactose (+) produzem colónias amarelas ou amarelas pálidas por acidificação do meio, já as bactérias que não fermentam a lactose produzem colónias verdes, azuis ou incolores. A composição do meio, por ter um fraco conteúdo em eletrólitos, previne a invasão de *Proteus* spp. (9)

Inicialmente as urinas seguem em tubo de triagem, onde primeiro é realizada a sementeira quantitativa (figura 2), com ansa calibrada de 1 µL em gelose CLED e, caso solicitada cultura para fungo, essa é feita em gelose de Sabouraud.



**Figura 2 – Sementeira quantitativa. [Silvana Agra; 2023]**

A gelose Sabouraud acrescida dos antibióticos Gentamicina Cloranfenicol é um meio seletivo recomendado para o isolamento de fungos a partir de amostras polimicrobianas, pois o aumento do nível de peptonas e dextrose favorece o crescimento de estirpes fúngicas. O

pH da gelose é ligeiramente ácido o que favorece mais o crescimento de fungos do que o crescimento de bactérias. (10)

A presença de gentamicina inibe muitas bactérias de Gram negativo e bactérias de Gram positivo enquanto a presença de cloranfenicol melhora a seletividade para certas espécies que podem ser resistentes à gentamicina. (10)

As placas de Sabouraud são incubadas em atmosfera de aerobiose a 35-37 °C por 48 a 72 horas, e as geloses CLED são incubadas em atmosfera de aerobiose a 35-37 °C por 18 a 24 horas.

As placas com crescimento bacteriano são analisadas pelo técnico, que faz a contagem do número de UFCs por mL de urina, multiplicando o número de colônias pelo fator de diluição, ou seja,  $10^3$  para uma ansa de 1  $\mu$ L. (11)

Sendo assim, a quantificação segue a seguinte classificação:  $<10^3$  UFC/mL quando se tem ausência crescimento;  $10^3$  UFC/mL quando apresenta um número de colônias entre 1 a 9 colônias;  $10^4$  UFC/mL quando apresenta um número de colônias entre 10 a 99 colônias; e  $10^5$  UFC/mL quando o número de colônias é igual ou superior a 100 colônias.

É importante notar que os valores mencionados acima são referentes a adultos e a quantificação deve estar atenta ao perfil do utente para consideração da valorização do crescimento bacteriano, já que fatores como idade e gestação impactam esse resultado. Bem como a variação histórica do utente.

Quando há uma ausência de crescimento bacteriano e uma contagem de leucócitos na análise de urina superior a 99 leucócitos, é necessária a realização de uma lâmina de Gram e a repetição da sementeira em Gelose chocolate. Quando existe o predomínio de uma cultura polimicrobiana, realiza-se o isolamento pela técnica de esgotamento em quatro quadrantes (Figura 3) das colônias suspeitas em meios seletivos. (11)



**Figura 3 – Sementeira por esgotamento em quatro quadrantes [Silvana Agra; 2023]**

Por último, as colónias isoladas seguem para identificação e seu respetivo antibiograma.

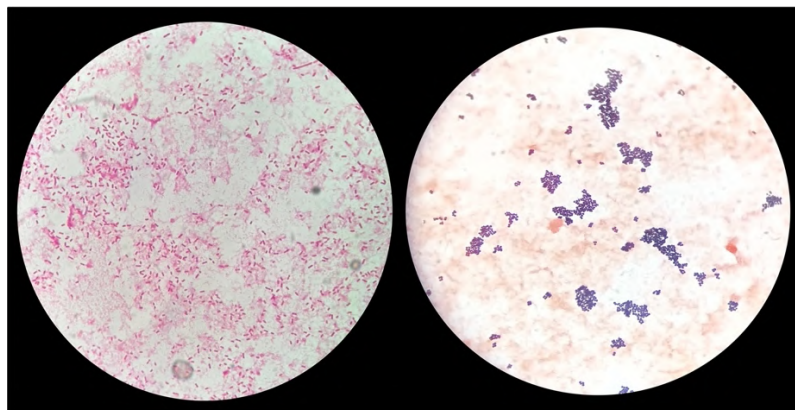
### **A. Técnicas de Coloração de Gram**

A bacterioscopia é realizada pela técnica de Gram com o intuito de classificar as bactérias provenientes da cultura quanto à sua morfologia e coloração. A composição da parede celular bacteriana determina a diferenciação das bactérias como de Gram positivo ou de Gram negativo. (12)

As bactérias de Gram positivo possuem uma parede espessa de peptidoglicano e grande quantidade de ácido teicóico. Por esse motivo, o corante inicial da coloração de Gram, o cristal violeta, é retido nas paredes das bactérias, não sendo alterado pela descoloração com álcool-acetona. Fenômeno esse que, visualmente, manifesta a coloração roxa nas bactérias Gram positivo na visualização microscópica. (12)

As bactérias de Gram negativo possuem uma camada mais delgada de peptidoglicano o que torna possível a descoloração do corante cristal violeta pelo descorante álcool-acetona. A subsequente coloração com a fucsina torna visualmente rosa as bactérias de Gram negativo na inspeção microscópica. (12)

Para a realização da coloração de Gram (Figura 4) é utilizado o equipamento Aerospray Gram - ELITech Group. O equipamento realiza a coloração de Gram de forma automatizada, utilizando, os corantes de cristal violeta, lugol, fucsina, o descorante álcool-acetona e água. (13)



**Figura 4 – Coloração de bactérias de Gram negativo (esquerda) e coloração de bactérias de Gram positivo (direita). [Silvana Agra; 2023]**

#### 4.1.1.2 Urinas tipo II

O exame de urina do tipo II auxilia no diagnóstico de doenças do trato urinário e na avaliação da função renal como um todo. Para além disso, também auxilia o diagnóstico de defeitos metabólicos como o diabetes mellitus, ajuda a avaliar a evolução de doenças e monitorizar a efetividade de uma terapia instituída. (14)

O exame da urina é subdividido em três partes: o exame físico, o exame químico e o exame microscópico do sedimento urinário. (14)

O exame físico engloba o aspeto da urina, a sua cor e densidade. A respeito desses, é importante mencionar: (14)

- O aspeto da urina pode ser límpido, representativo de uma urina saudável, ou pode ser ligeiramente turvo, representativo de indícios patológicos ligados a presença de bactérias, leucócitos e fungos. (14)
- A cor da urina saudável pode variar entre incolor a amarelo enquanto amostras de urinas não normais podem apresentar colorações diferentes indicativas de suas composições: laranja devido a presença de bilirrubina, vermelha devido a presença de sangue, castanho ou preto devido a excesso de ácido homogentísico e verde devido a origem medicamentosa. (14)
- A densidade da urina é uma medida semi-quantitativa representativa da concentração urinária. Urinas com densidade mais altas indicam urinas mais concentradas e o oposto também ocorre: urinas com densidade mais baixa são indicativos de urinas menos concentradas. (14)

O exame químico engloba a medição de pH, proteínas, glicose, urobilinogénio, bilirrubina, nitritos, hemoglobina e esterase leucocitária. A respeito desses, é importante mencionar:

- O pH da urina geralmente é ácido, mas um nível muito baixo de pH pode ser considerado patológico e indicativo de acidose tubular renal.
- A glicose na urina só se encontra presente em casos patológicos, e é evidência de que a carga de glicose filtrada excedeu a habilidade dos túbulos renais de absorvê-la.
- O urobilinogénio normalmente encontra-se presente na urina em pequenas quantidades, e, quando em grandes quantidades, indica dano hepático ou hemólise.
- A bilirrubina encontra-se presente na urina apenas em situações patológicas de interrupção da circulação entero-hepática.
- Nitritos podem ser positivos devido a presença de bactérias, podendo indicar assim uma possível infeção urinária.
- A presença de sangue na urina está ligada à presença de hemoglobina ou mioglobina na urina. Pode ser não-patológica, se for devida a uma contaminação menstrual, ou patológica nos casos de infeção no trato urinário, anemia hemolítica intravascular ou necrose tubular aguda.
- A esterase leucocitária é indicativa da presença de leucócitos na urina e é presente nos casos de inflamação aguda e infeção do trato urinário. (14)

O exame microscópico do sedimento urinário permite a visualização dos componentes insolúveis: células epiteliais, bactérias, elementos em forma de leveduras, cilindros, cristais, eritrócitos e leucócitos. Quando presentes, alguns não apresentam significados clínicos e outros em grande quantidade possuem significado clínico e auxiliam no diagnóstico de patologias:

- As células epiteliais são originárias do trato genitourinário, portanto são comumente encontradas na urina devido o processo de renovação celular.
  - As bactérias são encontradas nos quadros de infecção urinária.
  - Os elementos em forma de leveduras são constituintes da microbiota normal do trato genitourinário, mas, em grandes quantidades, podem ser considerados patológicos.
  - Os cilindros são elementos exclusivos do rim, são classificados de acordo com a sua matriz, podendo, ou não, ser considerados patológicos.
  - Os cristais são frequentemente encontrados na urina e raramente apresentam significado clínico, com exceção dos cristais de cistina e colesterol.
  - Os eritrócitos encontram-se elevados nos casos de lesão da membrana glomerular; na lesão vascular no sistema genitourinário; na litíase e nas infecções do trato urinário.
  - Os leucócitos encontram-se elevados nos casos de infecções do trato urinário.
- (15)

Após a realização das etapas do exame cultural, a urina segue para a realização do exame físico-químico e inspeção do sedimento urinário. Inicialmente as urinas são homogeneizadas e colocadas nas *racks* do equipamento Série-UN - Sysmex (Figura 5).



**Figura 5 – Equipamento Série-UN - Sysmex. [Silvana Agra; 2023]**

O Série-UN - Sysmex é um equipamento automatizado para análise de todos os aspectos da urina. Trata-se de um sistema modular composto dos analisadores UC-3500, o analisador da química de urina que utiliza a metodologia de tiras teste; o analisador UF-5000,

o analisador de partículas de urina através de citometria de fluxo; o UD-10, o dispositivo de imagens digital das partículas da urina através de citometria de imagem; e o U-Wam, o sistema de gerenciamento das informações. (16)

Todas as urinas percorrem pelo módulo UC, onde é realizada a análise química da urina através da tira de urina. As tiras são fitas comerciais com blocos impregnados de reagente, essas tiras reagem com a amostra de urina e mudam de cor quando o componente a que está direcionado está presente. É possível analisar parâmetros como pH, densidade, proteínas, glicose, corpos cetônicos, pigmentos biliares, hemoglobina, urobilinogênio, nitritos e esterase leucocitária. (14)

Quando os resultados desses parâmetros são normais, a urina automaticamente é validada e não passa por nenhum outro módulo. Entretanto, quando os resultados são positivos, a urina automaticamente passa ao módulo UF, onde, através da tecnologia de citometria de fluxo fluorescente, são avaliadas as propriedades fisiológicas e químicas das células e partículas da urina. (16)

Após isso, seguem para o módulo UD onde é possível a revisão das imagens dos leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais, bactérias, células em forma de leveduras e células epiteliais. (16)

#### **4.1.1.3 Urinas contagem minutada**

A análise de urina de contagem minutada tem como finalidade efetuar a contagem de elementos celulares e outros figurados, exprimindo os resultados por unidade de tempo. A recolha desta amostra é feita em contentor plástico de dois litros, onde o paciente esvazia completamente a bexiga para início da contagem do tempo e passa a recolher toda a urina até completar três horas. Como a degradação celular é contínua, deve se dar prioridade para o processamento dessas amostras. (17)

A urina entra no processo de análise de forma semelhante às urinas tipo II. Adicionalmente é realizada a visualização do sedimento da urina, após centrifugação, em microscópio ótico. O relatório final deverá conter o resultado da contagem de leucócitos, eritrócitos e células epiteliais, enquanto os demais elementos são mencionados quando existem. Os valores obtidos são matematicamente calculados para exprimir o resultado final em elementos/minutos:  $\text{Resultado} = (n \cdot 100 \cdot V) / 180$ , onde n representa a quantidade de contagem de elementos figurados por  $\mu\text{L}$  de sedimento, o V o Volume de 3h em mL e 180 o número de minutos. (17)

#### 4.1.1.4 Pesquisa de Micobactérias na urina

As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes, o que significa que, quando coradas, não se deixam decorar por uma mistura de álcool e ácido clorídrico. Essa propriedade decorre da firme fixação do corante a certos lípidos da parede celular, principalmente devido a presença dos ácidos micólicos que formam uma barreira hidrofóbica. (12)

A principal micobactéria de interesse do gênero *Mycobacterium* é a *Mycobacterium tuberculosis* para o diagnóstico de tuberculose. (12)

Para a realização da pesquisa de Micobactérias na urina é recomendada a primeira urina da manhã. Inicialmente são realizadas uma descontaminação e concentração da amostra com o kit Mycoprosafe- Salubris, o método consiste em uma descontaminação e concentração de hidróxido de sódio – N-acetil-L-cisteína (NALC), eliminando assim seletivamente outros microrganismos que são suscetíveis ao hidróxido de sódio, ao passo que as micobactérias, que são resistentes ao pH alcalino, sobrevivem. (18)

Após o tratamento da amostra, são feitas lâminas para coloração e a amostra tratada é utilizada para a cultura.

#### A. Técnicas de Coloração

Para a realização da coloração de micobactérias é utilizado o equipamento de coloração automático Aerospray TB que possui dois programas de coloração diferentes (Figura 6): a coloração por Carbol Fucsina e por Auramina. (19)

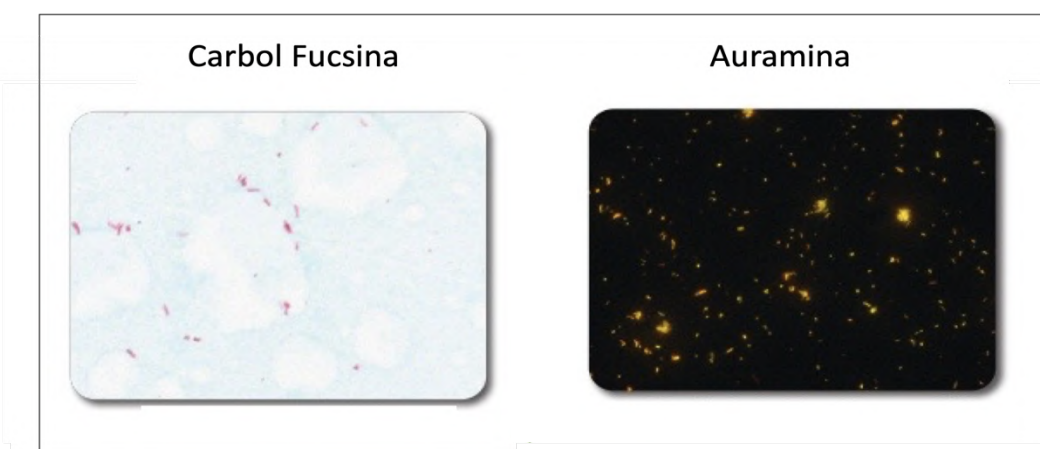


Figura 6 – Coloração de micobactérias. [Adaptado de (19)]

A coloração baseada na coloração de Ziehl-Neelsen é realizada com Carbol fucsina, que confere aos bacilos álcool-ácido resistentes uma cor rosa após a lavagem por álcool-ácido e todo o resto se cora de azul devido o azul de metileno. A técnica de fluorescência se baseia na coloração pela auramina, que permite a visualização dos bacilos álcool-ácido resistentes como bacilos amarelo-fluorescentes quando observados em microscopia de fluorescência. (19)

Na microscopia, deve-se observar, no mínimo, 100 campos para se determinar o resultado do exame como positivo ou negativo. O resultado é expresso conforme a tabela 2.

**Tabela 2 – Resultado expresso para micobactérias. [Adaptado de (20)]**

<b>Resultado</b>	<b>Observados em microscopia (1000x)</b>
Não se observaram BAAR	0 / 100 campos observados
Escrever o número observado	1-9 / 100 campos
+	10-99 / 100 campos
++	1-10 / campos
+++	> 10 / campo

## **B. Cultura para Micobactérias**

Para a cultura de micobactérias, utiliza-se o meio Lowenstein-Jensen, é um meio seletivo de enriquecimento que permite o isolamento, principalmente de *Mycobacterium tuberculosis*, devido a sua composição: L-asparagina, fécula de batata; fosfato monopotássico e sulfato de magnésio; glicerol e a suspensão de Ovo; citrato de sódio e o verde malaquita. Sobre esses componentes:

- A L-asparagina e a fécula de batata são as fontes de nitrogênio e vitaminas no meio.
- O fosfato monopotássico e Sulfato de Magnésio aumentam o crescimento do organismo e agem como tamponantes.
- O glicerol e a suspensão de ovo fornecem ácidos graxos e proteínas para o metabolismo das micobactérias. A coagulação da albumina do ovo, durante o processo de esterilização, fornece um meio sólido para a inoculação.
- O citrato de sódio e o verde malaquita são agentes seletivos que previnem o crescimento da maioria dos organismos contaminantes e permitem o crescimento inicial das micobactérias. (21)

Com a inoculação da amostra no meio, o tubo é disposto em posição inclinada e com a tampa semi-enroscada até a evaporação do líquido em ambiente de temperatura controlada a 37°C. Depois os tubos são fechados e mantidos para incubação, na mesma temperatura, por um período de 8 semanas. A verificação de crescimento na cultura é feita uma ou duas vezes por semana e, quando detetado macroscopicamente o crescimento na superfície, realiza-se um esfregaço para a confirmação de BAAR através da coloração de Ziehl-Neelsen. O bacilo da tuberculose cresce lentamente a 37°C e, de quatro a seis semanas, apresenta, em meio sólido, colónias eugónicas, esbranquiçadas e friáveis, de aspeto rugoso, em couve-flor e não produzem pigmento. (22)

#### **4.1.1.5 Pesquisa de *Trichomonas vaginalis* na urina**

A pesquisa de *Trichomonas vaginalis* na urina é uma ferramenta importante no diagnóstico de tricomoníase. É uma análise simples que consiste na visualização do parasita a fresco.

Para pesquisa de *Trichomonas vaginalis* na urina a amostra ideal é a urina de 1º jato após centrifugação de 10 minutos a 3500 r.p.m. Rejeita-se o sobrenadante e o sedimento é analisado entre lâmina e lamela no microscópio. (23)

#### **4.1.1.6 Pesquisa de *Ureaplasma* e *Mycoplasma* na urina**

A pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp. (incluindo *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*) na urina é importante para o diagnóstico de infeções do trato genitourinário. (24)

Para pesquisa de *Ureaplasma* e *Mycoplasma* na urina a amostra ideal é a urina de 1º jato após centrifugação de 10 minutos a 1500 r.p.m. (23)

O Mycoplasma IST 3 (Figura 7) é um teste de diagnóstico in vitro, qualitativo e semi-quantitativo, utilizado para identificação de *Ureaplasma* e *Mycoplasma*. No teste de sensibilidade a antibióticos, utiliza-se quatro antibióticos para *M. hominis* (Levofloxacina, Moxifloxacina, Tetraciclina e Clindamicina) e cinco antibióticos para *Ureaplasma* spp. (Levofloxacina, Moxifloxacina, Tetraciclina e Eritromicina). O Mycoplasma IST 3 consiste em um caldo de cultura selectivo e uma galeria contendo 25 testes. (24)



**Figura 7 – Teste IST 3 para Ureaplasma e Mycoplasma [Silvana Agra; 2023]**

A presença de substratos específicos (ureia para *Ureaplasma* spp. e arginina para *M. hominis*) e de um indicador (o vermelho de fenol) permitem, em caso de cultura positiva, visualizar uma mudança de cor do caldo devido ao aumento do pH. A seletividade em relação à flora de contaminação eventualmente presente na amostra é fornecida pela associação de três antibióticos e de um antifúngico. Após a inoculação da amostra, o caldo é dispensado na galeria do teste, e, depois de 48 horas, são observados os resultados de identificação e sensibilidade aos antibióticos. (24,25)

#### **4.1.1.7 Pesquisa de Antígenos urinários de *Legionella* spp.**

Dentro das pesquisas de patógenos na urina, a *Legionella pneumophila* é um dos principais causadores de pneumonia grave. (26)

O Teste Legionella K-SeT é um teste qualitativo que deteta antígenos solúveis do serogrupo 1 da *L. pneumophila* na urina. O teste consiste de partículas de ouro coloidal que são conjugados com anticorpos anti-Legionella monoclonais e policlonais secos sobre uma compressa absorvente de conjugado. (26)

#### **4.1.1.8 Pesquisa de Antígenos urinário de *Streptococcus pneumoniae***

A pesquisa da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, causadora da pneumonia pneumocócica, tem sua importância pois esse patógeno, quando não diagnosticado e tratado, pode levar a bacteremia, meningite, pericardite, empiema, púrpura fulminante, endocardite e artrite. (27)

O Teste BinaxNOW *Streptococcus pneumoniae* é um ensaio imunocromatográfico de membrana utilizado para detetar o antigénio pneumocócico solúvel na urina através do anticorpo anti-*S. pneumoniae* de coelho. (27)

#### 4.1.1.9 Pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* na urina

A pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* na urina é importante para o diagnóstico de infeções do trato genitourinário. Para essa pesquisa, a amostra ideal é a urina de 1º jato após centrifugação de 10 minutos a 3500 r.p.m. O sobrenadante é rejeitado e o sedimento é utilizado para a realização da lâmina de Gram, bem como para a realização da sementeira. A sementeira é realizada com uma ansa calibrada de 10 µl pela técnica de quatro quadrantes em uma gelose chocolate. (23)

A gelose chocolate é um meio para o isolamento de bactérias fastidiosas. O meio é composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e PolyViteX™ que favorecem o crescimento de estirpes exigentes pertencentes aos géneros *Neisserias*, *Haemophilus* e *Streptococcus pneumoniae*. (28)

A gelose chocolate é incubada em atmosfera com 5% de concentração de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 - 48 horas. Quando há crescimento, realiza-se a identificação e o antibiograma das colónias sugestivas de *Neisseria gonorrhoeae*. (23)

#### 4.1.2 Trato Génito-Urinário

Em amostras do trato génito-urinário, o diagnóstico é principalmente voltado a: as principais bactérias como *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* e nas grávidas *Streptococcus* do grupo B; a fungos como a *Candida albicans*; e a parasitas como a *Trichomonas vaginalis*, (8)

A análise das amostras de exsudado uretral, exsudado vaginal e esperma é realizada através do exame direto e da cultura. A pedido médico, pesquisas direcionadas são realizadas ao patógeno de interesse. A análise das amostras de zaragatoa retal e vaginal nas grávidas é realizado através da cultura.

## **A. Exame Direto**

O exame direto é realizado a fresco para a quantificação das células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos e pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. No caso do espermatozóide é realizada somente a pesquisa de *Trichomonas vaginalis* e a quantificação dos leucócitos.

São também preparados dois esfregaços, um é guardado para eventual necessidade de repetição e o outro é corado pelo método de Gram para a visualização microscópica. Sendo a microscopia importante para a interpretação dos exames culturais.

Para a realização da interpretação da microscopia é necessário o bom conhecimento da flora normal, especialmente nas amostras vaginais. A flora vaginal normal é constituída essencialmente por *Lactobacillus* (bacilos de Gram positivo). Em amostras patológicas, há a presença de leucócitos, leveduras, bactérias e a presença de “clue cells”, células epiteliais cobertas por bacilos de Gram variável que são sugestivas de vaginose bacteriana, infecção provocada por um conjunto de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios, sendo o principal a *Gardnerella vaginalis*. (8)

## **B. Pesquisa de *Trichomonas vaginalis*.**

Caso exista dúvida sobre a presença de *Trichomonas vaginalis* na visualização a fresco, é possível realizar o teste rápido de pesquisa de *Trichomonas vaginalis*.

O OSOM *Trichomonas* Rapid Test é um teste imunocromatográfico baseado em fluxo capilar. Diante da presença de *Trichomonas vaginalis* na amostra, forma um complexo com o anticorpo primário antitricomonas conjugado com partículas coloridas da cor (azul). Esse complexo se liga posteriormente a um segundo anticorpo antitricomonas revestido na membrana de nitrocelulose. Visualmente, o aparecimento de uma linha azul no teste é confirmatório da presença de *Trichomonas vaginalis*. (29)

## **C. Pesquisa de *Ureaplasma* e *Mycoplasma***

Para a identificação, cultura e teste de sensibilidade a antibióticos de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp.*, tal como na urina, é utilizado o teste *Mycoplasma* IST 3.

### **4.1.2.1 Exsudado Uretral**

A uretra normalmente contém poucos microrganismos, tais como: estafilococos, micrococos, corynebactérias e estreptococos alfa hemolíticos. As uretrites geralmente são

causadas por *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, Herpes simplex virus, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Haemophilus* spp. (8)

A análise do exsudado uretral é realizada através do exame direto e da cultura.

### **A. Exame Cultural**

A colheita do exsudado uretral é realizada com zaragatoa em meio Amies líquido. O meio é destinado a colheita e transporte de amostras clínicas preservando a viabilidade do microrganismo. É adequado para bactérias aeróbias, anaeróbias, fastidiosas, vírus e clamídias. Trata-se de meio composto de uma zaragatoa de fosfato inorgânico, sais de cálcio e magnésio e cloreto de sódio num ambiente reduzido (propício ao desenvolvimento de bactérias anaeróbias) devido à presença de tioglicolato de sódio. (30)

A zaragatoa é semeada em quatro quadrantes nos meios Gelose chocolate e VCAT, quando solicitada a cultura para fungos, essa é semeada em Sabouraud. As placas de gelose chocolate e VCAT são incubadas a 37 °C em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>. A gelose sabouraud é incubada a 37°C em aerobiose. As culturas são examinadas após 48 horas de incubação.

A gelose “Chocolate + gelose PolyViteX VCAT3” é um meio seletivo para o isolamento de *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* a partir de amostras polimicrobianas. O meio é composto por uma base nutritiva enriquecida com factores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e PolyViteX™. A seletividade do meio é obtida pela combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos que inibem a maioria das bactérias e leveduras, exceto as espécies de interesse. (31)

Após a leituras de todas as placas, as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma.

#### **4.1.2.2 Exsudado Vaginal**

O exame cultural do exsudado vaginal é importante para o auxílio do diagnóstico e tratamento das doenças mais recorrentes, que são: cervicite, vaginose bacteriana, vulvovaginite, doença inflamatória pélvica e lesões genitais. (8)

Muitas infecções do trato genital feminino têm origem em microrganismos endógenos da flora vaginal como: os lactobacilos; difteróides; *Gardnerella vaginalis*; Micoplasmas; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus agalactiae*; *Enterococcus* spp.; estreptococos alfa e gama hemolíticos; *Escherichia coli*; e leveduras. Entretanto, há agentes patógenos que tem a

sua entrada facilitada por fatores do hospedeiro como infecções primárias causadas por outros microrganismos como: herpes simplex vírus (HSV); o vírus papiloma humano (HPV); *Chlamydia trachomatis*; *Ureaplasma urealyticum*; ou ainda com infecções específicas como aquelas causadas pela *Neisseria gonorrhoeae*. (8)

### **A. Exame Cultural**

A colheita do exsudado vaginal é realizada com zaragatoa em meio Amies líquido. A sementeira de quatro quadrantes é realizada nos meios Gelose sangue, gelose chocolate e VCAT. Quando solicitada a cultura para fungos, essa é semeada em Sabouraud.

A gelose sangue é um meio com uma base nutritiva à qual se adiciona sangue fresco de ovelha para permitir análise de hemólise. As placas de gelose de sangue, gelose chocolate e VCAT são incubadas a 37°C em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>.

A gelose sabouraud é incubada a 37°C em aerobiose. As culturas são examinadas após 48 horas de incubação. Após a leituras de todas as placas as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (32)

### **4.1.2.3 Esperma**

A cultura do esperma (espermocultura) auxilia no diagnóstico e tratamento de doenças que acometem os homens como as uretrites e prostatites. Os microrganismos mais frequentes são: *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Enterobacterales*. (8)

### **A. Exame Cultural**

A colheita do esperma é realizada em frasco estéril. A sementeira de quatro quadrantes é realizada nos meios Gelose sangue, gelose chocolate e VCAT. Quando solicitada a cultura para fungos, essa é semeada em Sabouraud. A gelose sangue e chocolate são incubados a 37°C em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>. A gelose sabouraud é incubada a 37°C em aerobiose. As culturas são examinadas após 48 horas de incubação. Após a leitura de todas as placas, as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (33)

#### 4.1.2.4 Pesquisa de *Streptococcus* do Grupo B

Após as múltiplas pesquisas relacionadas à saúde gestacional, a pesquisa da presença do *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do grupo B apresenta-se como uma ferramenta particularmente importante para a saúde do recém-nascido. A presença desse patógeno é geralmente assintomática para a gestante, mas pode contaminar o recém-nascido no momento do parto, o que pode gerar quadros de meningite e septicemia bacteriana (34).

Por este motivo, o rastreio em gestantes no final do período gestacional é necessário, mais especificamente entre a trigésima quinta e trigésima sétima semanas. (34)

Na realidade do laboratório, a pesquisa por *Streptococcus agalactiae* é comumente feita através da cultura do exsudado vaginal e retal. (34)

##### A. Exame Cultural

Com o objetivo de identificar *Streptococcus* do grupo B, é realizada a cultura do exsudado vaginal e retal. O processo de cultura consiste em inocular as zaragatoas vaginais e retais em um caldo de enriquecimento seletivo para *Streptococcus* do grupo B (GBS): o Caldo Todd Hewitt. A composição do caldo favorece o crescimento do *Streptococcus agalactiae* numa flora polimicrobiana devido aos antibióticos presentes no meio: ácido nalidíxico e colistina. O Caldo é incubado a 37°C, em aerobiose, em estufa, durante 24 horas. No dia seguinte, o caldo é repassado por sementeira de quatro quadrantes em gelose Strepto B, que é o meio cromogénio seletivo para GBS. Esse meio consiste em uma base nutritiva que combina diferentes peptonas, três substratos cromogénios e antibióticos. A gelose Strepto B é incubada a 37°C, em aerobiose, em estufa, durante 24 a 48 horas. Se houver crescimento de colônias rosa-pálido a vermelhas, indicativas de *Streptococcus agalactiae*, seguirão então para a identificação. (34,35,36)

#### 4.1.3 Exsudado conjuntival/oftálmico

A colheita do exsudado conjuntival/oftálmico é importante para o diagnóstico e tratamentos de infecções por patógenos nessa região. Os agentes patogénicos mais frequentes são: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* e *Moraxella catarrhalis*. Para a pesquisa desses patógenos são realizados o exame direto e a cultura. (37)

## **A. Exame Direto**

Para a pesquisa de patógenos no exsudado conjutival/oftálmico, inicialmente é realizado o exame direto. Para a realização do exame direto, são preparados dois esfregaços e estes devem ser posteriormente corados por coloração de Gram e analisados microscopicamente. O exame direto é utilizado para auxiliar a interpretação da cultura.

## **B. Exame Cultural**

O exame cultural para a pesquisa de patógenos no exsudado conjutival/oftálmico é realizado com a colheita de uma zaragatoa em meio Amies líquido. A zaragatoa é semeada em quatro quadrantes nos meios: gelose sangue, gelose chocolate, gelose MacConkey e em Caldo Soja. Quando é solicitada a cultura para fungos, é semeada também em Sabouraud. Quando solicitada cultura direcionada para *Neisseria gonorrhoeae* em recém-nascidos, a zaragatoa é semeada também em VCAT. (37)

A Gelose MacConkey é um meio seletivo devido a sua composição de sais biliares e cristal violeta, favorecendo o crescimento de bactérias de Gram negativo. É um meio diferencial que distingue bactérias fermentadoras de bactérias não-fermentadoras. Isso se dá, pois, o cristal violeta em sua composição evidencia a fermentação da lactose através da viragem do vermelho neutro, apresentando assim colônias de coloração rosa a vermelho para as bactérias fermentadoras e colônias incolores, ou coradas de bege, para bactérias não-fermentadoras. (38)

Sobre o caldo de soja, este é usado para cultura e isolamento de microrganismos exigentes e não-exigentes. É composto de duas peptonas que permitem o crescimento de uma variedade de germes exigentes e não-exigentes. (39)

Após a sementeira, a Gelose sangue, gelose chocolate e VCAT são incubadas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37°C com leitura a 48 horas e a gelose MacConkey, Sabouraud e o caldo Soja são incubados em aerobiose a 35-37°C por 24 horas. A subcultura do caldo Soja é feita após 24h de incubação para Gelose chocolate e incubada em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> a 35-37°C com leitura após as 48 horas. Após as leituras de todas as placas, as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (37)

#### 4.1.4 Tracto Respiratório Superior

No tracto respiratório superior existe uma microflora comensal constituída por variados microrganismos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivaris*, espécies comensais de *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus* spp.

coagulase negativa, dentre outros. As infeções da laringe, nasofaringe, orofaringe, nariz, seios paranasais e ouvido médio são consideradas infeções de vias aéreas superiores e geralmente são causadas pelo desequilíbrio entre as bactérias comensais. (8)

Para a realização da pesquisa de patógenos no trato respiratório superior é realizado o exame direto e cultura ou teste rápido.

##### A. Exame Direto

Para a realização do exame direto, são preparados dois esfregaços e estes devem ser posteriormente corados por coloração de Gram para visualização no microscópio. A microscopia irá auxiliar na interpretação da cultura.

#### 4.1.4.1 Exsudado Orofaringeo/ amigdalino

O exsudado orofaringeo/amigdalino é útil no diagnóstico e tratamento de patógenos nessa região. O microrganismo clássico da faringite é o *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus do grupo A*). Para a pesquisa desse patógeno é realizado o exame direto e cultura ou o teste rápido. (8)

##### A. Exame Cultural

A colheita da zaragatoa para a cultura do exsudado orofaringeo/amigdalino é realizada em meio Amies líquido. A zaragatoa é semeada em sementeira de quatro quadrantes no meio CNA. Quando é solicitada a cultura para fungos, é semeada também em Sabouraud. Quando solicitada cultura direcionada para *Neisseria gonorrhoeae*, a zaragatoa é semeada também em gelose chocolate e VCAT.

A gelose CNA é um meio seletivo para bactérias de Gram positivo e permite a detecção de hemólise. Tem uma composição nutritiva composto por uma variedade de peptona que viabiliza o crescimento de bactérias fastidiosas. (42)

A gelose chocolate, CNA e VCAT são incubadas em concentração de 5% de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, com leitura após 48h. Já a gelose Sabouraud é incubada em atmosfera de aerobiose,

a 35-37°C, por 48 a 72 horas. Após a leitura de todas as placas, as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma.

## **B. Prova de Bacitracina**

Quando a cultura do exsudado orofaríngeo/amigdalino é solicitada somente para cultura de *Streptococcus pyogenes*, é realizada a prova de bacitracina. Tal prova consiste em semear em quatro quadrantes o exsudado da orofaringe em gelose de sangue e adicionar um disco de bacitracina. A gelose de sangue é incubada por 24 a 48 horas com 5% de concentração de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C. Após isso, é verificado o crescimento na placa com o intuito de visualizar colônias com β-hemólise, característica do *Streptococcus pyogenes*, e a sensibilidade à bacitracina. Caso seja visualizada a β-hemólise e a sensibilidade a bacitracina, a estirpe valorizada segue para a sua identificação e antibiograma. (43)

## **C. Pesquisa de Strepto A**

A pesquisa de *Streptococcus pyogenes* em amostras de orofaringe pode ser realizada ainda pelo método de teste rápido. O teste rápido Strep A é um imunoenensaio cromatográfico para a detecção qualitativa de antígenos de estreptococos do grupo A através de anticorpos específicos. (44)

### **4.1.4.2 Exsudado Nasal/ Nasofaríngeo**

A pesquisa de patógenos no exsudado nasal e nasofaríngeo é importante para o diagnóstico e tratamento de doenças. Principalmente causadas por bactérias e vírus. (8)

A pesquisa de bactérias no exsudado nasal é frequentemente requisitada no âmbito da medicina do trabalho para a detecção de portadores de *Staphylococcus aureus* e de *Neisseria meningitidis* nos trabalhadores em ambientes alimentares no intuito de prevenção à intoxicação alimentar em cantinas e restaurantes.

Também é realizada no âmbito hospitalar para detecção de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) por ser causador de infecções nosocomiais. (8)

As pesquisas de vírus no exsudado nasofaríngeo são frequentemente solicitadas para a elucidação de doenças do tracto respiratório. Essas são causadas principalmente pelo vírus Influenza, o vírus sincicial respiratório (RSV) e os adenovírus, que possuem 49 sorotipos, sendo mais comum as infecções dos tipos 2, 3, 5 e 7. (40)

A pesquisa de patógenos no exsudado nasal e nasofaríngeo é realizada através do exame direto e da cultura ou através de testes rápidos.

## **A. Exame Cultural**

O exame cultural para a pesquisa de bactérias no nariz é realizado através da colheita da zaragatoa nasal em meio Amies líquido. A zaragatoa é semeada em quatro quadrantes nos meios gelose sangue e gelose chocolate. Quando é solicitada a cultura para fungos, é semeada também em Sabouraud. A gelose sangue e chocolate são incubadas a 37°C em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>. Já a gelose sabouraud é incubada a 37°C em aerobiose. As culturas são examinadas após 48 horas de incubação. Após a leituras de todas as placas as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma.

## **B. Pesquisa de MRSA**

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina é realizada através da colheita da zaragatoa nasal em meio Amies líquido. A zaragatoa é semeada em quatro quadrantes no meio cromogénio MRSA e incubado a 37°C em aerobiose. A placa é examinada após 24 a 48 horas de incubação.

Sobre o meio cromogénio MRSA, esse possui uma base rica de nutrientes que combina diferentes peptonas. Contém ainda um substrato cromogénio de  $\alpha$ -glucosidase e uma combinação de vários antibióticos, incluindo a cefoxitina, que favorecem o crescimento do *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina. O crescimento de colónias azuis no meio sugere a presença de MRSA, sendo então enviadas para a sua identificação e antibiograma. (45)

## **C. Pesquisa de Influenza**

A pesquisa do vírus Influenza no exsudado nasofaríngeo é frequentemente solicitada para o diagnóstico e tratamento de doenças do tracto respiratório. (40)

A pesquisa do vírus Influenza é realizada através de teste rápido Inflú A+B K-SeT. Para a execução desse teste, é realizada a colheita da zaragatoa nasofaríngea em meio Amies líquido.

O teste rápido Inflú A+B K-SeT baseia-se no sistema de membrana homogénea com partículas de ouro coloidal para a deteção de antigénios das nucleoproteínas do influenza A ou B através dos anticorpos monoclonais. A solução composta do conjugado e amostra entra em contacto com a tira e migra por difusão passiva até entrar em contacto com o anticorpo dirigido contra as proteínas específicas de cada parte do teste. (46)

## **D. Pesquisa de RSV**

Dentro das pesquisas realizadas com o exsudado nasofaríngeo, a pesquisa pelo vírus sincicial respiratório (RSV) é ferramenta importante para o diagnóstico e tratamento de doenças do tracto respiratório. (40)

A pesquisa pelo RSV é realizada através de teste rápido RSV K-Set. A colheita para o teste é feita com zaragatoa nasofaríngea em meio Amies líquido

O meio de funcionamento do teste confia na reação entre um anticorpo monoclonal dirigido contra um epítipo da proteína F do RSV e um outro anticorpo monoclonal dirigido contra um segundo epítipo da proteína F conjugado com partículas de ouro coloidal. Quando o conjugado e o material de amostra entram em contacto com o anticorpo anti-RSV, em caso de presença do vírus, o complexo conjugado-RSV mantém-se ligado ao anticorpo anti-RSV adsorvido na nitrocelulose formando uma linha que aparece na tira. (47)

## **E. Pesquisa de Adenovirus**

As pesquisas pelo adenovírus no exsudado nasofaríngeo são solicitadas para o diagnóstico e tratamento de doenças do tracto respiratório. A pesquisa é realizada através de teste rápido Adeno Respi K-SeT. A colheita é feita com zaragatoa em meio Amies líquido.

O teste rápido Adeno Respi K-SeT baseia-se na tecnologia de membranas com nanopartículas de ouro coloidal. O conjugado e o material de amostra migram em tira por difusão passiva e entram em contacto com o anticorpo anti-Adenovírus adsorvido na tira de nitrocelulose. Se a amostra contiver Adenovírus, o complexo conjugado-Adenovírus permanece ligado ao anticorpo anti-Adenovírus formando uma linha que aparece na tira. A especificidade do teste deve-se a um anticorpo monoclonal dirigido contra antígenos de hexona específicos. (40)

### **4.1.4.3 Exsudado do Ouvido/ Auricular**

O exame bacteriológico do exsudado auricular é solicitado para identificação de patógenos em casos de doenças infecciosas. Os agentes patogénicos mais frequentes que geram essas infeções são: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. (41) A pesquisa de patógenos no ouvido é realizada através do exame direto e da cultura.

## **A. Exame Cultural**

O exsudado auricular é colhido com zaragatoa em meio Amies líquido. A zaragatoa é semeada em quatro quadrantes em gelose chocolate, gelose sangue e gelose CLED. Quando é solicitada a cultura para fungo, essa é semeada também em Sabouraud. As geloses chocolate e gelose sangue são incubadas em 5% de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, com leitura após 48h. As geloses CLED e Sabouraud são incubadas em atmosfera de aerobiose, a 35-37°C, por 24h a 48h. Após a leituras de todas as placas, as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (41)

### **4.1.5 Tracto Respiratório Inferior**

As principais amostras do trato respiratório inferior recebidas no laboratório de microbiologia são: expetorações, aspirados brônquicos e lavados brônquicos. As amostras são colhidas com o intuito de auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças do tracto respiratório geralmente causadas pela infecção pelos seguintes patógenos: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium* spp., *Mycoplasma pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. (8)

As pesquisas de patógenos em amostras do tracto respiratório inferior são realizadas através do exame direto e cultura.

## **A. Exame Direto**

A pesquisa de patógenos em amostras do tracto respiratório inferior é realizada inicialmente com o exame direto. Para a realização do exame direto, são preparados dois esfregaços pela técnica de estiramento, devendo ser posteriormente coradas pelo método de Gram para a microscopia. A microscopia é muito importante para avaliar a qualidade da amostra, considerando principalmente a presença de leucócitos, células epiteliais e o predomínio das bactérias.

Quando solicitada a pesquisa de micobactérias, são realizados adicionalmente mais quatro esfregaços, corados por Auramina.

Antes da realização dos esfregaços, é realizada uma descontaminação e concentração da amostra com o kit Mycoprosafe-Salubris, seguindo o mesmo procedimento para a pesquisa de micobactérias nas amostras de urina. No caso das amostras do trato respiratório inferior, o kit é usado não somente para concentração ou descontaminação das amostras, mas também como agente de redução da viscosidade da expetoração pela presença de NALC,

uma substância redutora, que reduz as ligações de dissulfato das proteínas do muco. Com isso, as amostras liquefazem-se, facilitando a sedimentação dos bacilos durante a centrifugação. (18)

## **B. Exame Cultural**

O exame cultural para a pesquisa de patógenos em amostras do tracto respiratório inferior é realizado através da colheita da amostra em frasco estéril. A amostra é semeada em quatro quadrantes nos meios gelose sangue, gelose MacConkey e gelose chocolate. Quando solicitado a cultura de micobactérias, a amostra é semeada em Lowenstein-Jensen. Quando solicitada a pesquisa por fungos, a amostra também é semeada em gelose sabouraud.

A gelose sangue e chocolate são incubadas a 37°C, em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>. A gelose MacConkey e a gelose sabouraud é incubada a 37°C, em aerobiose. As culturas são examinadas após 48 horas de incubação. Já o meio Lowenstein-Jensen é incubado a 37 °C, em posição inclinada, com a tampa do meio semi-enroscada, até a evaporação do líquido. Após a evaporação do líquido, o tubo é novamente enroscado e permanece incubado durante 8 semanas. Os tubos são examinados uma a duas vezes por semana. Quando detectado macroscopicamente o crescimento de colónias na superfície do meio, são feitas lâminas para a pesquisa de BAAR. Após a leituras de todas as placas, as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (22)

### **4.1.6 Pele, Tecidos moles e Ossos**

A pesquisa de agentes patológicos em amostras como pele, tecidos e ossos visa detetar patógenos que geram doenças infecciosas nesses tecidos. Os agentes patogénicos mais frequentemente encontrados são: *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus pyogenes* (Grupo A) e *Staphylococcus aureus*. (48)

Para a realização da pesquisa de patógenos em amostras como pele, tecidos e ossos é realizado o exame direto e cultura das amostras.

#### **A. Exame Direto**

Para a pesquisa de patógenos em amostras como pele, tecidos e ossos, é inicialmente realizado o exame direto. O exame direto é preparado a partir de dois esfregaços da amostra que são posteriormente corados por coloração de Gram.

#### **4.1.6.1 Feridas Superficiais**

As infecções superficiais tendem a ser mais frequentes em decorrência da exposição da pele aos agentes ambientais, o que aumenta o risco de trauma nessas áreas e facilita a colonização por agentes patogênicos. Nessas análises, os patógenos comumente encontrados são: *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp.

##### **A. Exame Cultural**

A pesquisa de patógenos em feridas superficiais é realizada através da cultura. A colheita do exsudado de ferida é feita com zaragatoa em meio Amies líquido. A zaragatoa é semeada em quatro quadrantes nos meios gelose sangue, gelose chocolate, gelose MacConkey e gelose Chapman. Quando solicitada a cultura para fungos, a zaragatoa é também semeada em gelose Sabouraud. (48)

A respeito da gelose Chapman, é um meio seletivo para estafilococos devido ao alto teor de cloreto de sódio. É um meio diferencial, pois os microrganismos que fermentam o manitol geram colônias amarelas, como é o caso do *Staphylococcus aureus*. (49)

A gelose sangue e a gelose chocolate são incubadas em atmosfera com concentração de 5% de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, por 24 a 48 horas, e as geloses MacConkey, Chapman e Sabouraud em atmosfera em aerobiose, a 35-37°C, por 24 a 48 horas. As leituras de todas as placas são feitas após 24 a 48 horas e as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (48)

#### **4.1.6.2 Feridas Profundas**

Os tecidos moles e ossos são mais resistentes a infecção e só são acometidos quando ocorre quebra das barreiras naturais como trauma ou situação pós-operatória. Os principais agentes patogênicos comumente encontrados nesses tecidos são: Bactérias anaeróbias, *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium* spp. (8)

##### **A. Exame Cultural**

A pesquisa de patógenos em feridas profundas é realizada através da cultura. Inicialmente é realizada a colheita do exsudado de ferida em zaragatoa em meio Amies líquido ou em frascos estéreis. Algumas amostras necessitam de tratamento inicial antes da realização das sementeiras por conta da natureza do material, como é o caso de alguns tecidos mais duros

ou ossos que passam por um sistema de desbridamento com esferas no equipamento Ultra Turrax IKA para facilitar assim a sementeira. (48,50)

A zaragatoa da ferida ou material é semeado em quatro quadrantes nos meios gelose sangue, gelose chocolate, gelose MacConkey e colocado no caldo de soja. Quando solicitada cultura para fungos, o material é semeado em Sabouraud. A Gelose sangue e a gelose chocolate são incubadas em atmosfera com 5% de concentração de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, com leituras após 48 horas; e a gelose MacConkey, Sabouraud e o caldo soja são incubados em atmosfera em aerobiose, a 35-37°C, por 24 a 48 horas. A subcultura do caldo é feita após 24 horas de incubação para a gelose sangue e incubada em atmosfera com 5% de concentração de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, com leitura após 48 horas. (48)

Para a cultura dos anaeróbios, a amostra é semeada em duas placas de Columbia hemina a 5%. Uma das placas de Columbia hemina é incubada a 35-37°C em aerobiose. A outra placa de Columbia hemina é inoculada com dois discos de antibióticos, Netilmicina e Penicilina, para facilitar a interpretação. Essa placa é incubada em anaerobiose, a 35-37°C, e, para isso, é utilizado o gerador de atmosfera GENbag anaer- BioMérieux. As leituras de todas as placas são feitas após 24 a 48 horas e as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (51,52)

#### **4.1.7 Sangue**

A cultura de sangue é realizada com o intuito de diagnosticar septicemia e detectar a presença de bactérias (bacteremia) ou fungos (fungemia) na corrente sanguínea. O sangue é um líquido originalmente estéril e completamente livre da presença de microrganismos. Por esse motivo, qualquer bacteremia ou fungemia é considerada patológica, desde que a colheita tenha sido realizada assepticamente. Entretanto, há a exceção de bacteremias transitórias que tendem a se resolver espontaneamente com a fagocitose das bactérias no fígado ou baço. Essas ocorrem em situações de cirurgias de membrana mucosa contaminada, tratamentos odontológicos, broncoscopia ou cateterização uretral. (53)

A septicemia causa respostas inflamatórias e metabólicas de diversos graus. Os sinais clínicos mais frequentes incluem febre, calafrios, indisposição, toxicidade, toxicidade e choque. (53)

Os principais agentes causadores de septicemia são: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans*. Bactérias como *Micrococcus* spp., corineformes, *Propionibacterium* spp. e *Bacillus* spp., quando isoladas em somente uma das amostras, são sugestivas de contaminação. (53)

Hemoculturas positivas devem ser considerado um valor crítico e devem ser imediatamente comunicados ao médico responsável. Primeiramente o resultado do Gram, e posteriormente a identificação acompanhada do antibiograma.

A fim de diferenciar a presença de um real patógeno ou uma possível contaminação de colheita, é muito importante a colheita de, ao menos, duas amostras de hemocultura (sendo cada amostra constituída por uma garrafa de aerobiose e uma garrafa de anaerobiose) e a colheita da ponta do cateter. (53)

#### 4.1.7.1 Hemoculturas

As garrafas de hemocultura colhidas para a pesquisa de patógenos no sangue devem ser enviadas ao laboratório o quanto antes para serem introduzidas no equipamento BacT/ALERT® (figura 8). Quando há a presença de microrganismos na garrafa, estes produzem dióxido de carbono devido a metabolização dos substratos existentes no meio. O equipamento BacT/ALERT® monitora as hemoculturas e seus níveis de CO<sub>2</sub>, mudando a cor do sensor no fundo da garrafa quando a amostra é positiva. (53,54)



**Figura 8 – Equipamento BacT/ALERT® [Silvana Agra; 2023]**

Se o nível de CO<sub>2</sub> não mudar significativamente ao fim de cinco dias, a amostra é considerada negativa para bactérias, após sete dias, é considerada negativa para fungos leveduriformes e, após trinta dias, negativa para fungos filamentosos. (53,54)

Após ser considerado positivo, é realizado o exame direto e a cultura do sangue para o isolamento do microrganismo.

## **A. Exame Direto**

Para o exame direto da hemocultura são realizados dois esfregaços e estes devem ser posteriormente corados por coloração de Gram para a microscopia. Inicialmente, a tampa do frasco de hemocultura é desinfetada com álcool 70% e, em seguida, com uma agulha, retira-se uma gota de sangue para realizar o esfregaço nas lâminas.

## **B. Exame Cultural**

Para a realização do exame cultural da hemocultura, a tampa da hemocultura é desinfetada e, com uma agulha, é colocada uma gota de sangue no meio de cultura. É realizada a sementeira de quatro quadrantes em gelose sangue se for uma hemocultura em aerobiose. Se for uma hemocultura em anaerobiose, são semeadas duas placas de Columbia hemina 5%. Uma das placas de Columbia hemina é incubada a 35-37°C em aerobiose, já a outra é inoculada com dois discos de antibióticos (Netilmicina e Penicilina) para facilitar a interpretação. Essa placa é incubada em anaerobiose a 35-37°C, sendo, para isso, necessário utilizar o gerador de atmosfera GENbag anaer. As leituras de todas as placas são feitas após 24 a 48 horas e as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (51)

### **4.1.7.2 Ponta de cateter**

Quando se deseja esclarecer se a fonte de contaminação do sangue é a ponta de cateter, colhe-se a ponta de cateter juntamente com a hemocultura, para a realização da cultura. (53)

## **A. Exame Cultural**

A colheita da ponta de cateter é realizada em frasco estéril. A sementeira é realizada pelo método de Maki, que consiste no método de rolamento da ponta do cateter para frente em gelose sangue. A gelose é incubada a 37°C em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>. A cultura é examinada nas primeiras 24 horas de incubação e, se não houver crescimento, é reincubada por mais 24 horas. Após a leitura da placa e sua contagem, as estirpes seguem para a sua identificação e antibiograma. (55)

### **4.1.8 Líquidos das cavidades naturais**

São considerados líquidos cavitários: líquido peritoneal/ascítico, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido sinovial e líquido cefalorraquidiano (LCR).

Os agentes microbianos mais frequentes isolados na peritonite são: as *Enterobacteriales*; *S. pneumoniae*; *Enterococos spp.*; e anaeróbios. No LCR, há incidência de: Pneumococos; Meningococo; *Haemophilus*; anaeróbios; e *Cryptococcus spp.* (8)

No líquido Pleural, são mais frequentes: *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; e bactérias anaeróbias. (56)

A pesquisa de patógenos nos líquidos cavitários é realizada através do exame direto e da cultura. Também são realizados testes para pesquisa direta no caso da pesquisa para *Cryptococcus spp.* no LCR.

### **A. Exame Direto**

O exame direto para a pesquisa de patógenos nos líquidos cavitários é realizado através da colheita do líquido em frasco estéril. São feitos dois esfregaços do material para serem corados por coloração de Gram e visualizados microscopicamente. No caso do LCR o resultado do Gram é considerado urgente e deve ser comunicado o mais rápido possível. (57)

### **B. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans***

Particularmente no caso do LCR, é realizada a pesquisa de *Cryptococcus neoformans* pelo método da tinta da china. O método consiste na visualização da amostra em microscópio, com a adição de uma gota de tinta da china, no intuito de visualizar leveduras encapsuladas compatíveis com *Cryptococcus neoformans*. (57)

### **C. Exame cultural**

O exame cultural para a pesquisa de patógenos nos líquidos cavitários é realizado através da colheita do líquido em frasco estéril ou em garrafa de hemocultura. Quando colhido em garrafa de hemocultura, a amostra é processa conforme já descrito no exame de hemocultura.

Quando o líquido é colhido em frasco estéril, o líquido é semeado em quatro quadrantes nas geloses: sangue, chocolate e MacConkey. Quando solicitada a cultura para fungos, é também semeado em Sabouraud. O líquido é ainda inoculado no Caldo de soja. A gelose sangue e gelose chocolate são incubadas em atmosfera com 5% de concentração de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, com leituras após 48 horas. Já a gelose MacConkey, o Sabouraud e o caldo soja são incubados em atmosfera em aerobiose, a 35 a 37°C, por 24 a 48 horas. A subcultura do

caldo soja é feita após 24h de incubação em gelose sangue e incubada em atmosfera com 5% de concentração de CO<sub>2</sub>, a 35-37°C, com leitura após as 48 horas. (40)

Para cultura dos anaeróbios, a amostra é semeada em quatro quadrantes em duas placas de Columbia hemina 5%. Uma das placas de Columbia hemina é incubada a 35-37°C em aerobiose. Já a outra placa de Columbia hemina é inoculada com dois discos de antibióticos (Netilmicina e Penicilina) para facilitar a interpretação. Essa placa é incubada em anaerobiose, a 35-37°C, sendo, para isso, necessário utilizar o gerador de atmosfera GENbag anaer. da bioMérieux. As leituras de todas as placas são feitas após 24 a 48 horas e as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (51)

#### **4.1.9 Fezes**

A flora bacteriana intestinal normal forma uma barreira natural contra o desenvolvimento de organismos patogênicos. O desaparecimento desta proteção associado à terapia antibiótica pode conduzir à proliferação de microrganismos patogênicos, endógenos ou adquiridos por via nosocomial. (58)

Para a pesquisa em laboratório, os microrganismos de interesse em amostra de fezes são principalmente: parasitas, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp, *Campylobacter* spp, *Helicobacter pylori*, *Clostridioides difficile*, *Adenovirus*, *Norovirus*, *Astrovirus* e *Rotavirus*. Quando há um pedido médico mais alargado, a pesquisa pode ser direcionada para o microrganismo solicitado como é o caso de *Staphylococcus aureus*, e *E. coli* O157:H7. (58)

A pesquisa destes patógenos é realizada através de pesquisas diretas, cultura e testes rápidos.

#### **A. Exame Cultural**

A pesquisa de patógenos em amostras de fezes é realizada através da cultura. A colheita das fezes é realizada em frasco estéril e semeada em quatro quadrantes nos meios: MacConkey, XLD e Campyloset. A amostra também é inoculada em caldo Rappaport. Caso haja solicitação de exame micológico, também é feita sementeira em Sabouraud e, caso haja pedido direto para pesquisa de *Staphylococcus aureus*, é feita a sementeira em Chapman.

Sobre os meios utilizados especificamente para a coprocultura, o XLD é um meio diferencial para *Salmonella* e *Shigella*. Este é também um meio diferencial, pois os microrganismos que possuem uma descarboxilase produzem colônias vermelhas por descarboxilação da lisina, enquanto as bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S formam colônias com

centro preto. As espécies que fermentam um dos três açúcares do meio formam colônias amareladas ou alaranjadas. As bactérias de Gram positivo são inibidos devido à presença de desoxicolato de sódio. (59)

O meio Campyloset é um meio seletivo para *Campylobacter* spp., principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, devido a presença de sangue ovino. A fertilidade é aumentada pelo uso de agentes redutores, e os contaminantes bacterianos e fúngicos são inibidos com antibióticos e antifúngicos. (60)

O caldo Rappaport é utilizado para o enriquecimento de *Salmonella* em uma flora polimicrobiana como as fezes. O caldo tem na sua composição peptona de caseína, extrato de levedura, cloreto de sódio, fosfato monopotássico, fosfato dissódico, cloreto de magnésio e verde malaquita. (61)

As placas de MacConkey, XLD, Sabouraud e o caldo Rappaport são incubadas em atmosfera de aerobiose, a 35-37°C, por 24 a 48 horas. O Campyloset é incubado em atmosfera de microaerofilia, através do uso de GENbag microaer. da BioMérieux, por 48 horas, a 42°C. Após 12 a 24 horas é realizada a subcultura do caldo Rappaport para XLD e incuba-se em atmosfera de aerobiose a 35-37°C, por 24h a 48h. As leituras de todas as placas são feitas após 48 horas e as estirpes valorizadas seguem para a sua identificação e antibiograma. (58,62)

## **B. Pesquisa de Parasitas**

Para a pesquisa de parasitas nas fezes, é realizado o exame parasitológico de fezes. Idealmente, na colheita, têm-se três amostras colhidas em dias não consecutivos, em decorrência da possível não eliminação de certos parasitas em uma única amostra, pois esta pode ser intermitente. As amostras são colhidas em frasco estéril.

O exame parasitológico é realizado utilizando o método de concentração de parasitas, o ParasiTrap System, antes da microscopia. O método visa concentrar os parasitas em um sedimento utilizando, para isso, técnica difásica, com uma solução de menor gravidade específica, formalina e acetato de etilo. A preparação do fresco é realizada entre lâmina e lamela e visualizada no microscópio. Nas objetivas de 10x e 40x é possível visualizar e identificar ovos, cistos e larvas de helmintos. (63,64)

## **C. Pesquisa de *Salmonella***

A pesquisa direta da bactéria *Salmonella* spp. nas fezes é realizada através de teste rápido. O Teste Certest *Salmonella* é um ensaio imunocromatográfico para a detecção

qualitativa de *Salmonella* em amostras de fezes. O teste consiste em uma membrana de nitrocelulose pré-revestida com anticorpos policlonais contra *Salmonella*. Se a amostra for positiva, os antígenos da amostra diluída reagem com o complexo conjugado de cor vermelha e os anticorpos capturam o conjugado colorido, deixando assim uma linha vermelha visível na linha teste. (65)

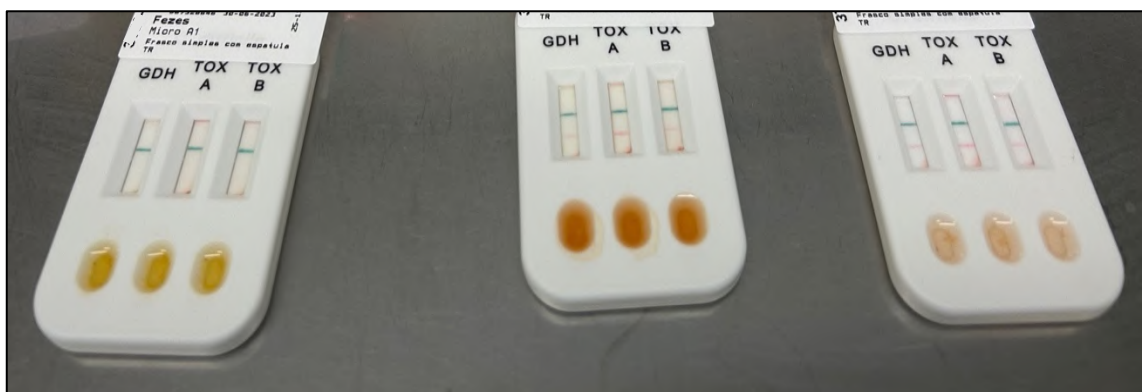
#### **D. Pesquisa de *Clostridioides difficile***

Afirma-se que *C. difficile* é o principal agente etiológico das colites pseudomembranosas (CPM) associadas a administração de antibióticos. As estirpes toxigênicas produzem uma enterotoxina (a toxina A), sendo esta um bom marcador da presença desta bactéria. (66)

A patogênese do *C. difficile* está relacionada com a sua capacidade de formar esporos e libertar a toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina). A produção das toxinas estimula a produção de fator de necrose tumoral e o aumento da permeabilidade vascular. O intenso processo inflamatório resulta na destruição da lâmina própria intestinal, impedindo a absorção de nutrientes. (66,67)

O *C. difficile* produz, em quantidade muito superior às outras toxinas, a GDH, uma enzima da parede celular. (68)

Para a pesquisa da enzima e das toxinas do *C. difficile*, é utilizado um teste rápido. O teste usado no laboratório é o teste Toxin/GDH Eco teste (figura 9).



**Figura 9 – Pesquisa de *C. difficile* [Silvana Agra; 2023]**

É um teste imunocromatográfico em membrana que utiliza anticorpos monoclonais específicos do glutamato desidrogenase (GDH) e das toxinas A e B do *C. difficile* para a detecção do antígeno e das toxinas. (68)

## **E. Pesquisa de Crypto e Giardia**

O *Cryptosporidium* e a *Giardia* são parasitas encontrados na água que causam doença intestinal, sendo a diarreia o principal sintoma. O *Cryptosporidium parvum* causa diarreia aquosa, cólicas, perda de peso, náusea e febre. A *Giardia intestinalis*, também conhecida como *Giardia lamblia* ou *Giardia duodenalis*, causa diarreia, fezes moles e aquosas, cólica estomacal e dores de estômago. (69)

Para o diagnóstico presuntivo de criptosporidiose, e/ou giardíase, é utilizado o teste CerTest Crypto+Giardia. O imunoensaio cromatográfico deteta qualitativamente o *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de fezes, de forma simultânea. Faz isso devido aos anticorpos monoclonais de camundongo anti- *Cryptosporidium* conjugado com látex de poliestireno vermelho na tira de diagnóstico Crypto, e na tira designada para *Giardia* há anticorpos monoclonais de camundongo anti-*Giardia* conjugado com látex de poliestireno vermelho. A amostra flui através da membrana por ação capilar e, se a amostra for positiva para os pesquisados, os antígenos da amostra diluída vão reagir com o complexo conjugado de cor vermelha apresentando uma linha vermelha de positividade para o item. (69)

## **F. Pesquisa de *Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* é uma bactéria em forma de espiral encontrada na camada mucosa gástrica, ou aderida ao revestimento epitelial do estômago. Seu diagnóstico é importante nas doenças gastrointestinais como a: gastrite, úlcera péptica e carcinoma gástrico. (70)

A pesquisa do *Helicobacter pylori* é realizada através de teste rápido. O CerTest *H.pylori* é um ensaio imunocromatográfico qualitativo para a determinação de *Helicobacter pylori* em amostras de fezes. Quando a amostra é positiva, os antígenos da amostra diluída reagem com o complexo conjugado de cor vermelha na tira teste, constituída de anticorpos monoclonais (anti-*Helicobacter pylori*) e microesferas de poliestireno vermelho. Formando a linha vermelha no teste, que indica o resultado positivo. (70)

## **G. Pesquisa de Rotavírus**

O Rotavírus é o principal agente causador da gastroenterite grave em bebês, crianças pequenas e adultos. Os principais sintomas da gastroenterite viral são: diarreia aquosa, vômitos, dor de cabeça, febre e dor de estômago. Os sintomas duram em torno de 3 dias. (71)

A pesquisa de *Rotavírus* nas fezes é realizada através de teste rápido. O CerTest *Rotavírus* é um ensaio imunocromatográfico qualitativo para a determinação de *Rotavírus* em amostra

de fezes. Quando a amostra é positiva, os antígenos da amostra diluída reagem com o complexo conjugado de cor vermelha na tira teste, constituída de anticorpos monoclonais (o anti-*Rotavírus*) e microesferas de poliestireno vermelho. Essa reação forma a linha vermelha na tira que indica estar positivo. (71)

## **H. Pesquisa de Adenovírus**

O *Adenovírus* é um dos principais vírus causadores de gastroenterite grave em bebês, crianças pequenas e adultos. Os principais sintomas da gastroenterite viral são: diarreia aquosa, vômitos, dor de cabeça, febre e dor de estômago. Os sintomas duram em torno de 5 a 8 dias. (72)

A pesquisa de *Adenovírus* nas fezes é realizada através de teste rápido. O CerTest *Adenovírus* é um ensaio imunocromatográfico qualitativo para a determinação de *Adenovírus* em amostra de fezes. Quando a amostra é positiva, os antígenos da amostra diluída reagem com o complexo conjugado de cor vermelha na tira teste, constituída de anticorpos monoclonais (o anti- *Adenovírus*) e microesferas de poliestireno vermelho. Essa reação forma a linha vermelha na tira que indica estar positivo. (72)

## **I. Pesquisa de Astrovírus**

O *Astrovírus* é outro vírus causador de gastroenterite grave em bebês, crianças pequenas e adultos. Os principais sintomas da gastroenterite viral são: diarreia aquosa, vômitos, dor de cabeça, febre e dor de estômago. Os sintomas duram em torno de 3 dias. (73)

A pesquisa por *Astrovírus* nas fezes é realizada através de teste rápido. O CerTest *Astrovírus* é um ensaio imunocromatográfico qualitativo para a determinação de *Astrovírus* em amostra de fezes. Quando a amostra é positiva, os antígenos da amostra diluída reagem com o complexo conjugado de cor vermelha na tira teste, constituída de anticorpos monoclonais, o anti- *Astrovírus* e microesferas de poliestireno vermelho. Formando a linha vermelha no teste, que indica a positividade. (73)

## **J. Pesquisa de Norovírus**

O diagnóstico do Norovírus é importante devido à sua etiologia da gastroenterite epidêmica em alguns países, incluindo surtos de origem alimentar. Os norovírus pertencem à família *Caliciviridae* e podem ser agrupados em cinco genogrupos (GI a GV), que são divididos em pelo menos 34 genótipos. Genótipos GI, GII e GIV infetam humanos, causando gastroenterite,

enquanto GIII e GV normalmente infetam animais. Os principais sintomas no ser humano são vômitos, diarreia aquosa e cólicas abdominais. (74)

A pesquisa de Norovírus nas fezes é realizada através de teste rápido. O CerTest Norovirus é um imunoenensaio cromatográfico colorido para a detecção qualitativa do genogrupo I e II do Norovírus em amostras de fezes. Quando a amostra é positiva, os antígenos da amostra diluída reagem com o complexo conjugado de cor vermelha na tira teste constituída de anticorpos monoclonais (o anti-Norovírus, genogrupo I e II) e microesferas de poliestireno vermelho. Formando a linha vermelha no teste, que indica a positividade. (74)

#### **4.1.10 Zaragatoa retal**

A colheita de zaragatoa retal é importante para o diagnóstico e tratamento de bactérias multirresistentes que podem ser responsáveis por infecções nosocomiais, principalmente as *Enterobacterales* produtoras de ESBL ( $\beta$ -lactamase de espectro alargado) e as Carbapenemases.

As ESBL, beta-lactamase de espectro estendido, são um grupo de enzimas de codificação plasmidial, derivadas das B-lactamases clássicas (TEM e SHV). Essas são capazes de hidrolisar as amino e openicilinas, cefalosporinas (exceto as cefamicinas) e os monobactams. Entretanto, não hidrolisam os carbapenens, pois a ação hidrolítica destas enzimas é bloqueada pelos inibidores de B-lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam). (75)

Carbapenemases são, por definição, beta-lactamases com capacidade de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos, como o imipenem ou meropenem. (76)

A detecção de portadores de *Enterobacterales* produtoras de ESBL e Carbapenemases são particularmente importantes para a prevenção e monitorização epidemiológica destas infecções no ambiente hospitalar, fazendo-se necessária a triagem dos pacientes na admissão e readmissão hospitalar, alargado para todos aqueles identificados com fatores de risco. (77)

A pesquisa das bactérias multirresistentes em zaragatoa retal é realizada através da pesquisa de ESBL e a pesquisa de Carbapenemases.

#### **A. Pesquisa de ESBL**

A pesquisa de ESBL é realizada através da colheita da zaragatoa retal em meio líquido Amies. A zaragatoa é semeada em CHROMID ESBL por sementeira de quatro quadrantes e

incubada em atmosfera em aerobiose, a 35-37°C, por 24 a 48 horas. Após a leitura da placa, a estirpe valorizada segue para a sua identificação e antibiograma.

Sobre o CHROMID ESBL, é um meio cromogénio seletivo para a triagem de *Enterobacterales* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido. Possui uma base nutritiva rica composta de várias peptonas e antibióticos que tornam o meio seletivo. Dois substratos cromogénicos e um substrato natural permitem a identificação direta das *Enterobacterales* produtoras de ESBL. A *Escherichia coli* apresenta uma coloração rosa a bordô; as *Enterobacterales*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* coloração espontânea verde, verde acastanhado ou azul; e o *Proteus* e a *Morganella* coloração castanha escura a castanha claro. (78)

## **B. Pesquisa de Carbapenemases**

A pesquisa de Carbapenemases é realizada através da colheita da zaragatoa retal em meio líquido Amies. A zaragatoa é semeada em CHROMID Carba por sementeira de quatro quadrantes e incubada em atmosfera em aerobiose, a 35-37°C, por 24 horas. Após a leitura da placa, a estirpe valorizada segue para a sua identificação e antibiograma.

Sobre o CHROMID Carba, é um meio cromogénio seletivo e diferencial para a identificação presuntiva de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, produtoras de carbapenemases. Possui uma base nutritiva rica composta de várias peptonas e antibióticos que tornam o meio seletivo. As espécies são distinguidas pela cor da colónia, sendo que as colónias presumíveis de *E. coli* produtoras de carbapenemases aparecem de rosa a bordô e as de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) aparecem azul-esverdeadas ou azul-acinzentadas. (76)

### **4.1.11 Pele, cabelo e unhas**

As micoses superficiais são infeções produzidas por fungos que podem afetar as unhas, pele e cabelo. Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados dos tecidos queratinosos cabelo, pele e unhas são os dermatófitos, um grupo de fungos ao qual pertencem os géneros *Epidermophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp. (79)

A pesquisa de fungos dermatófitos em amostras de pele, unha e cabelo é realizada através do exame direto e da cultura.

Para a realização do exame direto, a depender da consistência das amostras, pode ser necessário tratamento prévio. As amostras espessas, queratinizadas, viscosas ou opacas requerem a digestão com KOH a 20% de concentração, proporcionando índice de refração

ótimo para evidenciar o fungo na microscopia. Os componentes proteicos das células hospedeiras são digeridos parcialmente, deixando a célula fúngica intacta e mais visível. Hifas, leveduras e parasitas resistem à digestão do KOH e podem ser observadas nitidamente contra um fundo homogêneo. (80)

A identificação de fungos é facilitada pelo uso de colorações especiais. As colorações de Gram e Giemsa são utilizadas para evidenciar o fungo, que aparece corados, ou parcialmente corado, em roxo. O corante Azul de algodão é composto de lactofenol, em que o fenol atua como fluido de montagem, agindo com efeito citotóxico, precipitando proteínas celulares e inativando sistemas enzimáticos essenciais. O ácido láctico preserva as estruturas fúngicas impedindo que ocorra plasmólise e o azul de algodão atua como um corante diferencial para quitina e celulose. (80)

### **A. Exame Direto**

A pesquisa de fungos dermatófitos inicia-se com o exame direto. Para o exame direto são realizados dois esfregaços e estes devem ser posteriormente corados por coloração de Gram.

Para a realização do exame direto, é necessário transferir o material raspado para uma lâmina de microscopia, acrescentar de uma a duas gotas de KOH 20% e cobrir com uma lamela. Após isso, deve-se passar suavemente a lâmina na chama para facilitar a clarificação e aguardar por vinte minutos. Nesse ponto, é feita inspeção em microscópio em busca de estruturas fúngicas, com objetivas de 10 e 40x em baixa luminosidade. (80)

Em fungos já cultivados: em fungos leveduriformes retira-se uma porção da colônia com ansa e, em caso das estruturas macroscópicas de fungos filamentosos, retira-se uma parte da colônia de bolor, de preferência da periferia da colônia. Coloca-se 1 gota de lactofenol entre lâmina e lamela e observa-se em microscópio com o intuito de visualizar características microscópicas específicas que ajudem na identificação, juntamente com as características macroscópicas das colônias. (80)

### **B. Exame cultural**

O exame cultural de amostras como unhas, escamas de pele ou cabelo é realizado através da sementeira nos meios de cultura Sabouraud e Mycoline. O Mycoline é um meio seletivo dos fungos dermatófitos a partir de colheitas polimicrobianas. (81)

O Sabouraud é incubado em atmosfera de aerobiose, de 35 a 37°C, por 48 a 72 horas, e o Mycoline é incubado em atmosfera de aerobiose, de 25 a 27°C, por 30 dias. Quando há crescimento, as colônias seguem para identificação e possível antifungograma. (81,82)

#### 4.1.12 Identificação de Microrganismos

Após o processamento dos diferentes tipos de amostras, é realizada a valorização dos resultados obtidos através da análise do crescimento das placas, juntamente com a microscopia dos frescos e das lâminas. Os microrganismos de interesse isolados seguem para a identificação.

A identificação é realizada no Microflex LT - Bruker (figura 10) que consiste em um sistema de identificação microbiana que utiliza a tecnologia de espectrometria de massa de tempo de voo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, MALDI-TOF MS. O isolamento é feito direto da gelose, onde uma pequena porção da colônia é colocada num "biotarget" (uma placa alvo de aço) e é aplicada uma solução matriz de ácido-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) ao inóculo. Após a secagem completa ao ar, a placa é carregada no equipamento. No interior do espectrómetro de massa, a amostra é sujeita a múltiplos disparos de laser, a matriz absorve a luz do laser e, juntamente com a amostra, fragmenta-se, adquirindo carga elétrica neste processo (ionização). Os campos elétricos vão guiar iões para o tubo de vácuo, fazendo a sua separação por peso e tempo de voo, processo em que as moléculas menores vão se deslocar mais rapidamente que as maiores. (83,84)



Figura 10 – Equipamento Microflex - Bruker. [Silvana Agra; 2023]

Os resultados são exibidos sob a forma de uma série de linhas ou picos (os espectros), os quais vão corresponder aos diferentes fragmentos que se separaram das moléculas originais da amostra. Ao analisar os padrões de fragmentos, é possível deduzir a estrutura das moléculas. Os espectros da amostra são comparados com a base de dados de espectros de uma biblioteca de referência, usando um algoritmo bioestatístico, dando origem a uma pontuação entre 0,000 e 3,000. Quanto maior a pontuação, maior o grau de semelhança entre o padrão da lista de picos desconhecidos e a lista de picos do banco de dados da biblioteca de referência. (84)

As identificações também podem ser realizadas no Vitek 2 - Biomerieux (figura 11), quando necessita-se confirmar alguma identificação, ou quando não se consegue obter a identificação no Microflex. A identificação é realizada através da leitura contínua do crescimento microbiano na presença de certas substâncias. O aparelho deteta a atividade metabólica e enzimática dos microrganismos dentro dos poços das cartas. As leituras são realizadas por dois métodos óticos diferentes: fluorescência ótica e a transmitância ótica. (85,86)



**Figura 11 – Equipamento Vitek 2 – Biomerieux. [Silvana Agra; 2023]**

A identificação no Vitek inicia-se com a preparação de uma suspensão. Essa suspensão é preparada adicionando uma pequena quantidade do microrganismo de interesse a 3,0mL de solução salina estéril. Posteriormente, é verificada no subcomponente do Vitek, chamado DensiCHEK 2, se a turvação da suspensão está dentro da escala de McFarland necessária. Para uma suspensão bacteriana, é necessária uma escala de 0,5 a 0,625 McFarland e, para

uma suspensão de fungos, 1,8 - 2,2 McFarland. Depois, a suspensão é colocada na cassete de outro componente do Vitek: a Smart Carrier Station, onde a suspensão será associada à respectiva carta de identificação de acordo com a classe do microrganismo. As cartas utilizadas são: as cartas para bactérias de Gram negativo (Carta GN); cartas para identificação de bactérias de Gram positivo (Carta GP); cartas para identificação de microrganismos fastidiosos, como *Neisseria* spp., e *Haemophilus* spp. (Carta NH); cartas para bactérias anaeróbias (Carta ANC); e carta para identificação de leveduras (Carta YST). (86)

#### **4.1.13 Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana**

Após a identificação dos microrganismos, os mesmos seguem para a realização do teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA). O TSA é muito importante no tratamento dos processos infecciosos, pois determina a antibioticoterapia que deverá ser utilizada.

O TSA determina a CMI (concentração mínima inibitória), indicando se o microrganismo é suscetível, suscetível com aumento de exposição ou resistente a cada um dos antibióticos testados, baseando se nas normas EUCAST. É possível também, identificar padrões de resistência bacteriana como MRSA, ESBL ou KPC. A CMI é obtida através de um teste de diluição, podendo indicar ao médico a real concentração de um agente antimicrobiano necessária para inibir o organismo infetante. (86)

Os TSA são realizados de forma automatizada no aparelho MicroScan WalkAway - Beckman Coulter (Figura 12), através de painéis de microtitulação impregnados com substratos e antibióticos desidratados. Com o uso de um leitor fotométrico, o aparelho realiza leituras colorimétricas/turbidimétricas.



**Figura 12 - Equipamento MicroScan WalkAway - Beckman Coulter. [Silvana Agra; 2023]**

A preparação do painel de microtitulação para o MicroScan WalkAway se inicia com a preparação da suspensão microbiana. Essa é feita com um inoculador, em que se toma uma ou duas colônias de cultura prévia e se introduz no diluidor. Após isso, mistura-se delicadamente e despeja-se o conteúdo do diluidor na placa de inóculo sem fazer bolhas, até que cubra toda a placa. Depois utiliza-se o Dispensador MicroScan para transferir o inóculo para o painel que entrará no aparelho. No aparelho, o painel é incubado a 35°C.

Existem dois tipos de painel e são utilizados de acordo com o tipo de isolado, para bactérias de Gram positivo, utiliza-se o painel POS MIC 33, e para bactérias de Gram negativo, utiliza-se o painel NEG MDR MIC 1. Após finalizados, os painéis são retirados do WalkAway e é realizada a leitura das sensibilidades de cada poço pelo especialista. Os painéis também podem ser lidos no MicroScan autoSCAN 4 que é utilizado para uma leitura automatizada, sendo este um leitor mais sensível. Este é utilizado principalmente nos casos onde se apresentam bolhas, ou possuem inóculo insuficiente para ser processado no WalkAway. (87,88)

Os antibiogramas também podem ser realizados no VITEK. São realizados no VITEK os antibiogramas que não foram possíveis de serem realizados no MicroScan WalkAway, ou como forma de confirmação de resultados obtidos no mesmo. O princípio do antibiograma do VITEK, se baseia na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) através de uma

escala de diluições crescentes. A interpretação da CMI em categorias de sensibilidade é realizada seguindo os critérios dos comités internacionais.

Para realizar o antibiograma no VITEK, prepara-se uma suspensão bacteriana com uma densidade de 0,5 a 0,625 Macfarland. Coloca-se o tubo na cassette, com ou sem carta de identificação, e, na posição adjacente, um outro tubo vazio com a carta de antibiograma. Neste tubo, o VITEK preparará automaticamente o inóculo por diluição a partir da suspensão inicial. E, por fim, a cassette é introduzida no VITEK. (86)

As cartas utilizadas pelo laboratório são: AST-N426 para *Enterobacterales* isoladas de urinas; AST-N373 para *Enterobacterales* isoladas de outros produtos; AST-P648 para cocos de Gram positivo (*Staphylococcus* spp.); AST-ST03 para *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus beta hemolíticos* e *Streptococcus viridans*.; e AST-P586 para cocos de Gram positivo (*Enterococcus* spp.). (89,90,91,92,93)

Em alguns casos, quando não é possível obter resultados no MicroScan WalkAway ou no VITEK 2, pois alguns microrganismos são fastidiosos, padronizou-se a realização manual de alguns antibiogramas. Os antibiogramas manuais são realizados pelo método de difusão em disco, ou método de *Kirby-Bauer*.

Para esse método, inicialmente é realizada, com a bactéria de interesse, uma solução com concentração de 0,5 na escala de McFarland. A solução é posteriormente semeada em meio gelose Mueller Hinton de forma uniforme, quatro vezes em sentidos diferentes com uma zaragatoa. Coloca-se os discos de antibióticos, ou tira de ETEST, de acordo com o que é preconizado para aquela bactéria pelos critérios do EUCAST. Incuba-se a placa a 37 °C, durante 24 horas. Depois é realizada a leitura dos halos e atribuída a sensibilidade a aquele antibiótico.

O ETEST é uma tira impregnada com um gradiente de antibiótico, o que torna possível determinar a CMI pela linha de intersecção do crescimento bacteriano com a escala na respectiva tira.

Sobre o meio de cultura utilizado para testes de suscetibilidade antimicrobiana, o Agar Mueller Hinton é o meio utilizado por sua composição possibilitar o crescimento de bactérias não exigentes. Garantindo assim uma mínima interferência dos constituintes da fórmula no resultado da suscetibilidade antimicrobiana. A concentração de íons divalentes na gelose garante a determinação ideal da sensibilidade dos antibióticos que possuem atividade dependente de cátions. A baixa concentração de timina-timidina (inibidores sulfonamidas) restringe o crescimento ao redor dos discos, permitindo uma medição mais precisa das zonas de inibição. (94)

São exemplos de TSA realizados manualmente: para *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., bacilos de Gram negativo não fermentadores e *Burkholderia cepácea*.

Alguns TSA necessitam utilizar outros meios de cultura, em substituição ao Ágar Mueller Hinton, para a sua realização, de acordo com a necessidade do microrganismo. Para o TSA das *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, faz-se a substituição do Ágar Mueller Hinton por gelose Chocolate. Para bactérias fastidiosas, faz-se a substituição do Ágar Mueller Hinton por “Mueller Hinton agar + 5% horse blood + 20 mg/l  $\beta$ -NAD”, principalmente utilizado para *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus urinae* e *Haemophilus* spp.

Sobre o “Mueller Hinton agar + 5% horse blood + 20 mg/l  $\beta$ -NAD”, este possui uma composição que permite o crescimento de bactérias fastidiosas e garante a mínima interferência dos constituintes da fórmula no resultado de suscetibilidade antimicrobiana. Possui em sua composição peptona de caseína, extrato de carne, amido de batata, sangue de cavalo e  $\beta$ -NAD. (95)

Além da realização dos testes de suscetibilidade antimicrobiana, que determinam a sensibilidade das bactérias aos antibióticos, também é realizado o antifungigrama para a determinação da suscetibilidade dos fungos aos antifúngicos.

O antifungigrama é realizado com o kit Fungitest da Bio-Rad, em que se avalia o crescimento dos fungos leveduriformes diante de seis agentes antifúngicos: Flucitosina, Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol, Cetoconazol e Miconazol. A determinação do crescimento se baseia na redução do indicador de coloração, que modifica o meio de azul para rosa. Azul quando não há crescimento (levedura sensível ao antifúngico) e rosa quando há crescimento (levedura resistente ao antifúngico). (96)

A realização do antifungigrama consiste na preparação de uma suspensão da levedura. São suspensas duas colónias da levedura em estudo em 3mL de água destilada estéril, visando alcançar uma concentração de 1 na escala McFarland. Feito isso, dilui-se 100  $\mu$ L deste inóculo em 1.9 mL de água destilada estéril. Retira-se daí 20  $\mu$ L dessa solução para se introduzir no meio de suspensão fornecido com o kit. Após isso, distribui-se 100  $\mu$ L desta suspensão em cada poço da microplaca e cobre-se a com a película adesiva.

A incubação para as leveduras é feita a 37°C durante 48h e para *C. neoformans* a 32°C durante 72h. Após esse período é possível realizar a leitura para obter o resultado.

Quando o poço possui a coloração azul significa que não há crescimento, logo a estirpe é inibida pelo agente antifúngico in vitro. Quando se obtém a cor rosa/azul é porque existe um crescimento reduzido, logo a estirpe é intermédia. Já quando o poço está rosa significa que houve crescimento, logo a estirpe não é inibida pelo agente antifúngico in vitro. (97)

## 4.2 Setor de Bioquímica

O presente capítulo descreve as principais determinações analíticas da área de bioquímica. Essa área realiza o estudo das funções do nosso organismo e as suas alterações, auxiliando na prevenção, diagnóstico e tratamento de diversas patologias.

O setor de bioquímica do laboratório UNILABS possui os principais doseamentos realizados no setor Core, e algumas outras análises mais complexas são realizadas no setor de técnicas especiais.

Inicialmente, na triagem, as amostras do setor de bioquímica passam por um pré-tratamento, onde são novamente centrifugadas quando oriundas de postos. Além disso, as amostras são analisadas visualmente para a detecção de algum tipo de critério de rejeição ou outro fator que influencie nos parâmetros bioquímicos, como: amostras hemolisadas, com fibrina ou pouco volume.

Após isso, as amostras são distribuídas automaticamente pelo equipamento AUTOMATE 2550- Beckman Coulter (figura 13), onde as amostras são colocadas em suportes distintos de acordo com o equipamento em que vão ser realizadas as análises. A distribuição é feita de acordo com o tipo de amostra: soro, urina, ou conforme a urgência da análise.



Figura 13 - Equipamento AutoMate 2550 - Beckman Coulter. [Silvana Agra; 2023]

#### 4.2.1 Atellica Solution

No setor Core, grande parte das análises são realizadas no equipamento Atellica Solution Siemens (Figura 14), que é composto pelos módulos *Atellica Magline Transport*, *Atellica Sample Handler* (SH); *Atellica Chemistry Analyzer* (CH) 930; e *Atellica Immunoassay Analyzer* (IM) 1600.



**Figura 14 - Equipamento Atellica Solution 1600(Siemens Healthineers) [Silvana Agra; 2023]**

O Core Laboratorial é composto por três linhas de processamento de amostras, e cada uma das linhas de processamento está acoplado um Atellica Sample Handler, que faz a gestão das amostras, das calibrações e controlos. Conta com um Interface primário do utilizador, que é o ponto de controlo do sistema. (56)

A seguir descrevo os equipamentos que compõem essas linhas:

O *Atellica Magline Transport* é o responsável pelo transporte das amostras entre o Sample Handler e os analisadores. Apesar das transportadoras moverem um tubo por vez, elas são dotadas de duas posições para tubos, o que permite um transporte bidirecional para aumentar a eficiência do processo. Assim, um braço robótico pode colocar um novo tubo em transporte ao mesmo tempo em que move o tubo que completou a aspiração. (98)

O *Atellica® Sample Handler* (SH) faz a gestão das amostras e a gestão das calibrações e controlos, o que permite fazer os controlos de qualidade e as calibrações automáticas. Utiliza um braço robótico que é capaz de pegar num tubo de amostra da gaveta e colocá-lo na transportadora do *Atellica Magline Transport*. Quando a aspiração é concluída pelo

módulo de análise, o tubo retorna para a gaveta do *Sample Handler*. A gaveta possui uma série de oito câmaras iluminadas que são capazes de fotografar a gaveta para determinar as características da *rack* e do recipiente da amostra. Com isso, verifica a presença ou ausência de tampa nos recipientes, o ponto central dos recipientes de amostra, bem como, a sua altura e diâmetro.

As informações obtidas pelas câmaras da gaveta do *Sample Handler* são confirmadas através do sistema de caracterização dos tubos, dotado de três outras câmaras. Com elas, o sistema é capaz de ler os códigos de barras das amostras no momento em que o braço robótico do *Atellica Magline Transport* coloca as amostras na transportadora. O *Sample Handler* possui ainda uma área de armazenamento mantida entre 2 a 8°C onde os calibradores e controles são armazenados. (98)

O *CentralLink* é um sistema de gestão de dados clínicos que faz a interface entre os resultados do controle de qualidade e das amostras. (98)

O *Atellica Chemistry Analyzer (CH) 930* é um analisador de química clínica que usa testes fotométricos e testes de potenciometria para alcançar seus resultados. Os testes fotométricos usam uma fonte de luz e um conjunto de detecção, enquanto os testes de potenciometria usam uma tecnologia multisensor integrada (IMT) para testes de eletrólitos. (99)

A respeito da fotometria do *Atellica Chemistry Analyzer*, o equipamento possui um fotômetro que consiste de uma fonte de luz e um conjunto de detecção montados no anel de reação. Este fotômetro mede a absorvância da luz das amostras à medida que elas passam entre a fonte de luz e o conjunto de detecção.

As absorvâncias são então convertidas em resultados que são relatados no sistema. Quanto maior a quantidade da substância analisada na amostra, que é atravessada pela luz emitida, maior será a quantidade de luz absorvida. Sendo assim, a quantidade de luz absorvida está diretamente relacionada com a concentração da substância, sendo possível de prever de acordo com a Lei de Lambert-Beer. (100)

A respeito da potenciometria do *Atellica Chemistry Analyzer*, o sistema de Tecnologia de Multisensor Integrada (IMT) usa potenciometria indireta através do multisensor integrado A-LYTE para determinar a concentração dos íons de sódio, potássio e cloreto na amostra do paciente. O multisensor é composto por quatro elétrodos: três elétrodos seletivos de íons (ISE) para sódio, cloreto e potássio, e um eletrodo de referência. (101)

Uma amostra diluída é posicionada no sensor e os íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> estabelecem um equilíbrio com a superfície do eletrodo. É gerado um potencial proporcional ao logaritmo da atividade do analito na amostra. O potencial elétrico gerado numa amostra

é comparado ao potencial elétrico gerado numa solução padrão, sendo que a concentração dos íões pretendidos é calculada através da equação de Nernst (101)

O sistema usa um algoritmo para converter as diferenças de potencial em concentrações de íões e, assim, reportar o valor. (99)

O *Atellica Immunoassay Analyzer* (IM) 1600 é um sistema automatizado de imunoensaio que mede a quantidade de luz emitida durante a reação quimioluminescente desencadeada pela alteração de pH. Essa alteração dá-se em decorrência da adição de um ácido e uma base no final da reação. (102,103)

O IM utiliza a tecnologia avançada de éster de acridínio (AE). A molécula de AE é composta por três partes: um sistema de anel tricíclico de acridínio, um éster dimetilfenólico e um N- éster hidroxisuccinimidil (NHS). O anel de acridínio, com seu nitrogênio quaternário, é responsável pela reação de quimioluminescência. A conjugação é efectuada através do éster NHS. Os dois grupos metila que flanqueiam o éster fenólico fornecem proteção estérica melhorando assim a estabilidade quimioluminescente. (102,103)

Os analisadores são capazes de realizar o doseamento em diferentes tipos de amostras como: soro, plasma, líquidos biológicos e urinas. Tais doseamentos permitem o estudo das funções de determinados órgãos através de marcadores específicos, auxiliando o diagnóstico de diversas patologias. (99)

#### **4.2.1.1 Metabolismo dos Glúcidos**

Os glúcidos, as proteínas e os lípidos são as principais formas de obtenção de energia pelo organismo, através da oxidação dessas moléculas orgânicas complexas. Sendo os glúcidos a principal fonte para o cérebro, eritrócitos e retina. (104)

##### **A. Glicose**

A glicose é um hidrato de carbono e a principal fonte de energia celular. A determinação da glucose é feita para o diagnóstico e tratamento de distúrbios do metabolismo de hidratos de carbono como: diabetes mellitus, hipoglicemia neonatal, hipoglicemia idiopática e sobredosagem de insulina. (105)

O teste é realizado no *Atellica Chemistry Analyzer* e são utilizados como amostra: soro, líquido cefalorraquidiano, plasma (heparina de lítio, EDTA com potássio, fluoreto de sódio/oxalato de potássio) e urina. O teste baseia-se no ensaio de Slein, através da reação

enzimática da hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A glicose é fosforilada por trifosfato de adenosina (ATP) na presença de hexoquinase. A glicose-6-fosfato formada é oxidada na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase, causando a redução de nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado (NAD) para nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido (NADH). A absorvância de NADH é medida como uma reação de ponto final a 340 a 410nm. (105)

O valor de referência, em adultos, no soro/plasma é de 74 a 106 mg/dL, na urina é <0,5 g/dia e no líquido cefalorraquidiano de 40 a 70 mg/dL. (105)

### **B. Prova de tolerância oral à glicose- PTGO**

Além da determinação da glicose em jejum, existem provas de tolerância à glicose que avaliam a depuração da glicose em circulação após uma sobrecarga. É uma ferramenta importante no diagnóstico de doentes com inexplicável nefropatia, neuropatia ou retinopatia, e na avaliação de tolerância diminuída à glicose, com valores de glicemia em jejum menores que 140mg/dL. (104)

Para realização da prova, o utente deve estar em jejum e manter-se em jejum até o final da prova. Inicialmente, deve-se realizar a glicose capilar e essa não deve ser superior a 160mg/dL. Colhe-se a glicose em jejum e o paciente ingere a solução de glicose. (106)

A solução deve ser preparada de acordo com o peso do utente, quando se tratar de crianças de até 12 anos: peso do paciente (Kg) x 1,75g glicose (até ao máximo de 75g glicose). Quando se tratar de adultos, ou crianças com idade superior a 12 anos: 75g glicose dissolvidos em 175 mL de água. (106)

Após a ingestão da solução de glicose, regista-se a hora e são feitas colheitas de sangue após 120 minutos. No caso de grávidas, faz-se também uma colheita após 60 minutos e outra após 120 minutos. (106)

O valor de referência em adultos, após duas horas pós-prandial é < 120 mg/dL. (107)

### **C. Insulina**

A insulina é uma hormona produzida pelas células  $\beta$  dos ilhéus de Langherhans do pâncreas. São essas as células que detetam o aumento da glucose no organismo e libertam insulina para que ocorra o aumento da entrada da glucose na célula para seu metabolismo. (104)

A determinação da insulina é realizada no diagnóstico e tratamento de diabetes mellitus e hipoglicemia. (108)

O teste para a detecção da insulina é realizado no *Atellica Immunoassay Analyzer*, utilizando como amostra o soro. É um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais, que recorre à tecnologia da quimiluminescência direta. Utiliza quantidades constantes de dois anticorpos, sendo o primeiro anticorpo o reagente Lite, que é um anticorpo anti-insulina monoclonal de rato marcado com éster de acridina, e o segundo anticorpo, na fase sólida, um anticorpo anti-insulina monoclonal de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Obtém-se os valores da insulina devido a relação direta da quantidade de luz relativa detetada pelo sistema e quantidade de insulina presente na amostra. (108)

O valor de referência em adultos no soro é de 3,0 a 25,0 mU/L. (108)

#### **D. Péptido C**

O péptido C é uma hormona produzida pelas células  $\beta$  dos ilhéus de Langherhans do pâncreas. É proveniente da proinsulina, que se divide em insulina e o péptido C. (109)

A determinação do péptido C é realizada a fim de auxiliar no diagnóstico e tratamento de doentes com secreção anormal de insulina, incluindo diabetes mellitus.

O teste para a detecção do péptido C é realizado no *Atellica Immunoassay Analyzer*, utilizando como amostra o soro e urina. É um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais, que recorre à tecnologia da quimiluminescência direta. Utiliza quantidades constantes de dois anticorpos: o primeiro anticorpo é o reagente Lite, um anticorpo antipéptido C monoclonal de rato marcado com éster de acridina; e o segundo anticorpo, na fase sólida, um anticorpo antipéptido C monoclonal de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas. Obtém-se os valores do péptido C devido a relação direta da quantidade de luz relativa detetada pelo sistema e quantidade de insulina presente na amostra. (109)

O valor de referência em adultos no soro é de 0,81 a 3,85 ng/mL e na urina <156,46  $\mu$ g em 24 horas. (109)

#### **E. Interpretação**

Nos indivíduos saudáveis, situações de hiperglicemia provocam um aumento da secreção de insulina, permitindo assim a entrada de glucose nas células do fígado, músculo e tecido adiposo. Numa situação patológica, essa glucose não é aproveitada, o que pode ser devido a uma deficiência relativa ou absoluta de insulina, causando assim a diabetes mellitus.

A doença pode progredir e causar complicações específicas como retinopatia, falência renal, neuropatia e aterosclerose. (104)

A diabetes é classificada em quatro tipos clínicos e etiologicamente distintos. A diabetes do tipo 1, causada pelo déficit absoluto de insulina devido à destruição das células  $\beta$  do pâncreas. Tipo 2, devido a um defeito progressivo na secreção de insulina. Diabetes gestacional, que é um grau de intolerância a glucose que ocorre pela primeira vez na gravidez. E outros tipos específicos de diabetes, como as diabetes por endocrinopatias, como na doença de Cushing ou devido a medicamentos ou indução química, como nos casos pós-transplante. (104,110)

Podem ainda ocorrer casos de hiperglicemia intermédia, que podem apresentar um risco aumentado ao desencadeamento de diabetes e doença cardiovascular. São esses casos, a anomalia da glicémia em jejum (glucose em jejum com valor  $\geq 110$  e  $< 126$  mg/dL), e a tolerância diminuída a glucose após uma sobrecarga de glucose (com glucose pós-prandial  $\geq 140$  e  $< 200$  mg/dL). (104,110)

O diagnóstico de diabetes é realizado com os resultados obtidos de uma glucose em jejum  $\geq 126$ mg/dL, além de sintomas clássicos acrescidos de glicemia ocasional  $\geq 200$ mg/dL, glucose pós-prandial na prova de tolerância a glucose oral  $\geq 200$  mg/dL e hemoglobina glicada A1c  $\geq 6,5\%$ . (110)

O doseamento do péptido C auxilia no diagnóstico dos doentes com diabetes mellitus, pois permite uma avaliação das reservas secretoras de insulina endógena e é considerado um indicador mais fiável da secreção da insulina do que a própria insulina. (109)

O diagnóstico da diabetes gestacional é realizado com os resultados de glucose em jejum obtidos na primeira consulta de gravidez ( $\geq 92$ mg/dL e  $< 126$ mg/dL). Se a glucose em jejum for  $< 92$  mg/dL, realiza-se a PTGO nas 24 a 28 semanas de gestação. Confirma-se a diabetes gestacional se obter um dos valores: glucose em jejum  $\geq 92$ mg/dL, a 1 horas a glicemia  $\geq 180$  mg/dL e as 2 horas a glicemia  $\geq 153$  mg/dL. (110)

Situações de hipoglicemia podem ser devido a uma menor produção de glucose por parte do fígado, ou uma maior utilização desta proveniente de jejum prolongado, exercício físico exacerbado, excesso de insulina exógena ou endógena, tumor das células  $\beta$  e inibição da neoglucogénese pelo álcool. Os valores de glucose para hipoglicemia são  $< 45$  a 60 mg/dL, sendo que valores menores que estes podem comprometer a função cerebral e causar disfunção severa no sistema nervoso central. (104)

#### **4.2.1.2 Metabolismo dos lípidos**

Os lípidos são compostos orgânicos com pouca solubilidade em solução aquosa e solúveis em solventes orgânicos. Possuem diversas funções importantes e são parte de elementos estruturais e funcionais das membranas celulares. Atuam como hormonas ou como seus precursores, auxiliam na digestão, são fonte de armazenamento de energia, permitem a condução nervosa do sistema nervoso central e atuam como isolante contra a perda de calor corporal e protegem os órgãos de lesões. São clinicamente importantes os ácidos gordos, colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidos. (111)

##### **A. Colesterol Total**

O Colesterol é um esteroide encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo. É indispensável como precursor dos ácidos biliares, na síntese das hormonas esteroides e na síntese da vitamina D. O colesterol presente no nosso organismo é obtido por ingestão, a partir de alimentos de origem animal, e produzido de forma endógena principalmente no fígado e intestino. Após a sua síntese, o colesterol é transportado no sangue, 2/3 sob a forma de éster e 1/3 na forma livre, pelas lipoproteínas: Q (quilomícrons), VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), IDL (lipoproteína de densidade intermédia), LDL (lipoproteína de baixa densidade), HDL (lipoproteína de alta densidade) e Lpa (lipoproteína a). (112)

O doseamento do Colesterol total é útil no diagnóstico de distúrbios do metabolismo de lípidos e lipoproteínas. (113)

O teste é realizado no Atellica CH, utilizando como amostra soro e plasma (heparina de lítio). O teste baseia-se no método enzimático que utiliza a conversão colesterol-esterase e colesterol-oxidase seguida de um ponto final Trinder. A enzima colesterol-esterase hidrolisa os esteres de colesterol em colesterol e ácidos gordos livres. O colesterol é convertido em colest-4-en-3-ona pela colesterol-oxidase na presença de oxigénio para formar peróxido de hidrogénio. É formado um composto colorido a partir do peróxido de hidrogénio, da 4-aminoantipirina e do fenol mediante a influência catalítica de peroxidase. A absorbância do composto é medida como uma reação de ponto final a 505 a 694 nm. (113)

O valor de referência em adultos é < 200 mg/dL. (107)

##### **B. Colesterol LDL**

O colesterol é insolúvel no sangue, mas passível de ser transportado pelo sistema circulatório sob a forma de complexos macromoleculares chamados lipoproteínas. A

lipoproteína de baixa densidade (LDL) conduz o colesterol às células periféricas, onde este é necessário. (114)

O doseamento do Colesterol LDL é útil no diagnóstico e tratamento de aterosclerose. (114)

O teste para a detecção do Colesterol LDL é realizado no Atellica CH, utilizando como amostra o soro e plasma (EDTA, heparina de lítio e heparina sódio). O ensaio está num formato de dois reagentes. O detergente 1 liberta o colesterol não-LDL que é consumido pela colesterol-esterase e pela colesterol-oxidase numa reação não formadora de cor. O detergente 2 solubiliza as restantes partículas de LDL. O LDL solúvel é oxidado pela ação da colesterol-esterase e da colesterol-oxidase, formando colesteno e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A ação enzimática da peroxidase em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produz cor na presença de N,N-bis(4-sulfobutil)-m-toluidina, sal dissódico (DSBmT) e 4-aminoantipirina (4-AA), que é medida utilizando uma técnica bicromática de ponto final no comprimento de onda de 545 a 694 nm. A cor produzida é diretamente proporcional à quantidade de colesterol LDL presente na amostra. (114)

O valor de referência em adultos é < 160 mg/dL. (107)

As concentrações dos Colesteróis LDL e VLDL também podem ser obtidas de forma indireta, através da utilização da equação de Friedewald, que é exata para amostras cujas concentrações de triglicéridos não ultrapassem 400 mg/dl e não pertençam a pacientes portadores de lipoproteinemia do Tipo III. (112)

Equação de Friedewald:

Colesterol VLDL = Triglicéridos / 5

Colesterol LDL = Colesterol Total - (HDL + VLDL)

### **C. Colesterol HDL**

A lipoproteína de alta densidade (HDL) conduz o colesterol da rede sanguínea ao fígado, onde este é reciclado ou eliminado do organismo. (115)

O doseamento do Colesterol HDL é útil no diagnóstico e tratamento de aterosclerose. (115)

O teste para a detecção do Colesterol HDL é realizado no Atellica® CH, utilizando como amostra o soro e plasma (EDTA, heparina de lítio e heparina sódio). O método possui um formato em dois reagentes e depende da metodologia Acelerador-Detergente Seletivo. Este método baseia-se na aceleração da reação da colesterol-oxidase (CO) com colesterol não-

HDL não esterificado, e na dissolução seletiva de HDL utilizando um detergente específico. (115)

No primeiro reagente, o colesterol não-HDL não esterificado é sujeito a uma reação enzimática, e a peroxidase gerada é consumida por uma reação de peroxidase com DSBmT, produzindo um produto incolor. O segundo reagente é composto por um detergente capaz de solubilizar especificamente o HDL, a colesterol-esterase (CE) e o acoplador cromogénico para desenvolver cor para a determinação quantitativa de colesterol HDL. (115)

O valor de referência em adultos é de 30 a 70 mg/dL. (107)

#### **D. Triglicéridos**

Os triglicéridos são lípidos hidrossolúveis compostos por três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol. Através da ação das lipases pancreáticas e intestinais, e na presença de ácidos biliares, os triglicéridos são hidrolisados em glicerol, monoglicerol e ácidos gordos. São absorvidos por tecidos adiposos para armazenamento ou por outros tecidos como fonte de energia. (112)

O doseamento dos triglicéridos é útil no diagnóstico e tratamento de pacientes com diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática e outras doenças relacionadas ao metabolismo dos lípidos. (116)

O teste para a deteção dos triglicéridos é realizado no Atellica CH, utilizando como amostra soro e plasma (EDTA potássico, heparina de lítio e heparina sódio). O ensaio é baseado no procedimento enzimático onde a amostra é incubada com reagente de enzima lipoproteína lipase que converte os triglicéridos em glicerol livre e ácidos gordos. A glicerol quinase catalisa a fosforilação do glicerol pelo adenosina-5-trifosfato (ATP) e converte-a em glicerol-3-fosfato. A glicerol-3-fosfato-oxidase oxida o glicerol-3-fosfato e converte-o em fosfato de di-hidroxiacetona e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). A ação catalisadora do peróxido forma quinoneimina a partir do peróxido de hidrogénio, aminoantipirina e 4-clorofenol. A formação de quinoneimina causa alteração na absorbância que é diretamente proporcional à quantidade total de glicerol e dos seus precursores na amostra e é medida através de uma técnica biocromática de ponto final no comprimento de onda de 505 a 694 nm. (116)

O valor de referência em adultos é de 35 a 160 mg/dL. (107)

## E. Interpretação

As dislipidemias são alterações metabólicas das lipoproteínas devido a perturbações funcionais no metabolismo dos lípidos. Essas alterações acarretam na elevação nos níveis séricos dos lípidos, devido a uma excessiva produção ou devido a deficiência de lipoproteína. Sendo assim, esses distúrbios podem, por si só, provocarem o desenvolvimento de aterosclerose e interagirem com outros fatores de riscos cardiovasculares. (112)

O diagnóstico das dislipidemias é realizado com o doseamento dos parâmetros de Colesterol total, Colesterol LDL, Colesterol HDL e dos triglicéridos. Em casos mais complexos, são realizados os doseamentos das apolipoproteínas A (ApoA), apolipoproteínas B (Apo B) e lipoproteínas A (Lpa). (117)

Os pacientes devem, não somente, ser classificados de acordo com os níveis de lípidos plasmáticos, mas também de acordo com o risco cardiovascular global. Para a avaliação do risco cardiovascular, pode se calcular as relações entre o colesterol total e o colesterol HDL, e a relação entre o colesterol LDL e o colesterol HDL. Os resultados do valor do colesterol total dividido pelo valor do colesterol HDL devem ser menores do que cinco. E o valor do colesterol LDL dividido pelo valor do colesterol HDL deve ser menor que três. (112,117)

A utilização do colesterol total é recomendada para estimativa de risco cardiovascular global através do sistema SCORE (*Systemic Coronary Risk Estimation*). Em Portugal adotam-se as tabelas SCORE para populações europeias de baixo risco. Valores aumentados de colesterol são encontrados na nefrose, hipotireoidismo, doenças colestáticas do fígado e nas hiperlipoproteinemias dos tipos IIa, IIb e III. Níveis diminuídos são encontrados no hipertireoidismo e desnutrição crônica. (112,117)

Existe uma comprovada correlação entre os níveis do colesterol sérico, mais especificamente o colesterol LDL, e a prevalência de doenças cardiovasculares. Ao passo que o colesterol HDL tem efeito protetor. (112)

As quilomicra e as VLDL, contribuem significativamente para os níveis dos triglicéridos no sangue e não parecem ser aterogênicos, mas concentrações elevadas destas lipoproteínas e de triglicéridos são um fator de risco para a pancreatite.

São causas de elevação dos triglicéridos, as várias doenças chamadas hiperlipidemias ou hiperlipoproteinemias. Nestas, sejam de causas primárias ou secundárias, ocorre elevação dos triglicéridos nos tipos I, IIb, III, IV e V. (112)

As hiperlipidemias ocorrem secundariamente no diabetes, pancreatite, doença do armazenamento de glicogênio, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, gravidez e mieloma múltiplo. Várias mulheres em uso de estrogênios ou

contraceptivos orais apresentam aumento nas concentrações de triglicéridos. A hipertrigliceridemia também se encontra associada ao uso de bloqueadores beta-adrenérgicos, corticosteróides, diuréticos tiazídicos e retinóides. Níveis baixos podem ser encontrados na Abetalipoproteinemia, hipobetalipoproteinemia, má absorção, desnutrição e hipertireoidismo. (112)

#### **4.2.1.3 Metabolismo das Proteínas**

As proteínas plasmáticas originárias da dieta são sintetizadas sobretudo no fígado. São uma das moléculas biológicas mais importantes devido às suas várias funções como: transporte, armazenamento, imunidade, manutenção da pressão oncótica e como tampão. O organismo conserva as proteínas e os seus constituintes, e só uma pequena parte é excretada na urina e nas fezes. (118)

##### **A. Proteínas Totais - Soro**

As proteínas totais são um parâmetro analítico que avalia, no seu conjunto, as proteínas no plasma ou noutros fluidos biológicos. Refletindo a síntese, as perdas e as alterações de volémia. (118)

O doseamento das proteínas totais é útil no diagnóstico e tratamento de pacientes de várias doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea. (119)

O teste para a deteção das proteínas totais é realizado no Atellica CH, utilizando como amostra soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é baseado no método de Weichselbaum utilizando o reagente de biureto e sulfato cúprico numa solução alcalina, onde as ligações peptídicas de proteínas interagem com os iões cúpricos para formar o complexo roxo que é medido como uma reação de ponto final no comprimento de onda de 545nm. (119)

O valor de referência em adultos é de 6,0 a 7,8 g/dL. (107)

##### **B. Proteínas Totais – Outros fluidos biológicos**

As proteínas totais são um parâmetro analítico que avalia no seu conjunto as proteínas noutros fluidos biológicos, como na urina e no LCR. (118)

O doseamento das proteínas totais na urina é útil no diagnóstico e tratamento de doenças renais. O doseamento das proteínas totais no LCR é importante no diagnóstico de doenças do sistema nervoso central (SNC). (120)

O teste para a detecção das proteínas totais é realizado no Atellica CH, utilizando como amostra urina e LCR. O ensaio é uma adaptação do método colorimétrico vermelho de pirogalol, em que o vermelho de pirogalol combina-se com o molibdato de sódio para formar complexo vermelho com absorvância máxima de 470nm. A proteína da amostra reage com este complexo em solução ácida para formar o complexo de cor roxo-azulado que é absorvido a 600nm. (120)

O valor de referência na urina é de 1 a 14 mg/dL, e de 15 a 45 mg/dL no LCR. (120)

### **C. Albumina**

A albumina é a proteína mais abundante nos fluidos extra vasculares e tem como principais funções a manutenção da pressão oncótica e a ligação e transporte de um grande número de compostos. (118)

O doseamento da albumina é útil no diagnóstico e tratamento de doenças inflamatórias crônicas, disfunções de colagénio e disfunções hepáticas e renais. (121)

O teste para a detecção da albumina é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é baseado no método de Doumas, Watson e Biggs que utiliza a solução verde de bromocresol (BCG) como corante de fixação que se liga à albumina para formar um complexo de albumina-BCG, que é medido como uma reação de ponto final a 596 a 694 nm. (121)

O valor de referência em adultos é de 3,5 a 5,5 g/dL. (107)

### **D. Proteína C reativa**

A proteína C reativa (PCR) é uma das primeiras proteínas de fase aguda a se elevar durante a resposta geral e não específica a infecções e a processos inflamatórios não infecciosos. (122)

O doseamento da PCR é útil na detecção e avaliação de infecções, lesões de tecido e distúrbios inflamatórios. (122)

O teste para a detecção da PCR é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é baseado na técnica de imunoensaio turbidimétrico melhorado por partículas. Essas partículas são sintéticas, revestidas com anticorpos contra a PCR, que se agregam na presença de PCR na amostra. A turbidez é medida a 340nm, sendo a turbidez proporcional à concentração de PCR na amostra. (122)

O valor de referência em adultos idealmente é < 10 mg/dL. (107)

## E. Interpretação

A hiperproteinémia ocorre nos casos de desidratação, suores abundantes, vômitos ou diarreias. Ocorre também devido ao aumento de síntese de proteínas. (118)

A hipoproteinémia ocorre por síntese hepática diminuída devido a fatores genéticos, por incapacidade de síntese, ou por falta de matéria prima. Pode ocorrer devido à excreção aumentada na urina em decorrência de lesão renal. Ocorre ainda devido a um aumento de volémia devido a hemodiluição por intoxicação com água, ou soluções parentéricas continuadas. Ou ainda, pode ser fisiológica, como ocorre na gravidez. (118)

O aumento da excreção das proteínas totais na urina pode ser considerado patológico quando está acima de 150 mg/dL em urina de 24 horas em adultos; e acima de 300 mg/dL em urina de 24 horas em crianças, adolescentes e grávidas. Essa proteinúria pode ser uma proteinúria transitória, como nos casos que são devido a febre, exercício físico intenso, frio, gravidez, convulsões e infecções. Pode também ser uma proteinúria intermitente ou postural que geralmente ocorre em adolescentes e em ortostatismo prolongado. Ou ainda, proteinúria persistente quando associada a pressão arterial aumentada. (118)

A etiologia da proteinúria pode ser glomerular ou tubular. Quando glomerular é devido ao aumento de permeabilidade glomerular, é seletiva como em casos de formas transitórias ou não seletiva como em casos das glomerulonefrites. Quando tubular é por diminuição de reabsorção tubular, como nos casos de Doença de Wilson; cistinose; e nefrite túbulo-intersticial, ou devido ao aumento de filtração causado por perfusão de albumina, mielomas e linfomas. (118)

As proteínas totais encontram-se elevadas no LCR devido ao aumento da permeabilidade e devido a síntese intratecal. O aumento da permeabilidade pode ocorrer devido a um aumento de pressão intracraniana, por hemorragia, por dano traumático, ou por inflamações como as meningites ou encefalites. O aumento da síntese intratecal ocorre devido o aumento de IgG, desmielinização do sistema nervoso central e na esclerose múltipla. (118)

A hiperalbuminémia ocorre devido a desidratação aguda. Enquanto a hipoalbuminémia ocorre devido a síntese diminuída, devido a excreção aumentada e devido a fatores genéticos. A Analbuminémia é um exemplo de uma condição genéticas, onde o valor de albumina pode chegar a  $< 1\text{mg/mL}$ . A síntese diminuída pode ocorrer devido a doenças hepáticas, má absorção e má nutrição. Já a excreção aumentada pode ser fisiológica devido ao aumento de permeabilidade capilar por prática de exercício físico, por febre, ou na gravidez. (118,123)

O aumento da PCR ocorre após enfarte, stress, trauma, infecção, inflamação, cirurgia ou proliferações neoplásicas. (118)

#### **4.2.1.4 Avaliação da Função Hepática**

O fígado é um órgão funcionalmente complexo que possui funções essenciais à vida. Está envolvido no metabolismo das proteínas, glúcidos e lípidos. Recebe, processa e armazena substâncias absorvidas a partir do trato gastrointestinal. Além disso, é responsável pelo processamento e excreção de substâncias endógenas e exógenas na bÍlis e na urina. (124)

##### **A. Bilirrubina Total, Direta e indireta**

A bilirrubina é um pigmento proveniente da destruição da hemoglobina no citoplasma dos macrófagos; da eritropoiese ineficaz; e catabolismo de outras proteínas que contem grupos heme, como: a mioglobina, citocromos e peroxidase. (124,125)

A sua formação ocorre nas células do sistema reticuloendotelial principalmente no baço. A bilirrubina formada por estas células (bilirrubina não conjugada ou bilirrubina indireta) é insolúvel em água, necessitando assim, de se ligar reversivelmente à albumina para ser transportada no plasma até o fígado. (124)

No hepatócito, a bilirrubina liga-se, em parte, a uma proteína citoplasmática, a ligandina, que garante que a bilirrubina indireta não retorne para o plasma. Em seguida, a bilirrubina é direcionada para o retículo endoplasmático, onde é convertida, pela ação da enzima UDP-glicuronosil transferase, num composto solúvel em água (bilirrubina conjugada ou direta). A bilirrubina total representa a soma das duas frações, a direta e a indireta. (124)

O doseamento da bilirrubina total é útil no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, hemolíticas, hematológicas e metabólicas, como: hepatites e doença da vesícula biliar. O doseamento da bilirrubina direta é útil no rastreio de disfunções hepáticas e no diagnóstico de icterícia hepática. O doseamento da bilirrubina indireta é útil no diagnóstico de icterícia pré-hepática e anemias hemolíticas. (126,127)

O teste para a detecção da bilirrubina total é realizado no Atellica CH, utilizando como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é baseado no método de oxidação química, utilizando o vanadato com pH 2,9 para oxidar a bilirrubina direta e indireta para produzir biliverdina. A reação de oxidação provoca a redução na densidade ótica da cor amarela, o que é específico da bilirrubina. Sendo a redução na densidade ótica a 451 - 545nm proporcional à concentração de bilirrubina total na amostra. (126)

O teste para a detecção da bilirrubina direta é semelhante ao descrito para a bilirrubina total. Entretanto, é utilizado o vanadato com pH 3 que oxida apenas à bilirrubina conjugada. (127)

Para se obter o valor da bilirrubina indireta, é utilizado o resultado dos doseamentos da bilirrubina total e da bilirrubina direta. Dado que a diferença entre o valor das duas equivale ao resultado do valor da bilirrubina indireta. (124)

O valor de referência da bilirrubina total em adultos é de 0,1 a 1,0 mg/dL; da bilirrubina direta de 0,0 a 0,3 mg/dL; e da bilirrubina indireta é de 0,3 a 1,0 mg/dL. (107,125)

## **B. Fosfatase Alcalina**

As fosfatases alcalinas são monoesterases que hidrolisam os ésteres fosfóricos orgânicos em pH alcalino, sendo o pH 8,5 considerado ótimo. Composta por um conjunto de, pelo menos, cinco isoenzimas, as fosfatases alcalinas estão presentes em quase todo o organismo, como, por exemplo, no fígado, ossos, intestino, rins, pulmões, globos vermelhos e placenta. Entretanto, cerca de 80% da atividade fosfatídica circulante é representada por isoenzimas com origem hepática e óssea. (125)

O doseamento da fosfatase alcalina (FAL) ou das suas isoenzimas é útil no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, ósseas, paratiroideas e intestinais. (128)

O teste para a detecção da fosfatase alcalina é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é baseado no procedimento de Bowers e McComb. A fosfatase alcalina catalisa a transfosforilação do p-nitrofenilfosfato (p-NPP) para p-nitrofenol (p-NP) na presença do tampão de transfosforilação 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP). A variação do p-NP é medida utilizando uma técnica de velocidade bicromática no comprimento de onda de 410 a 478nm. (128)

O valor de referência em homens é de 30 a 100 U/L, e em mulheres é de 45 a 115 U/L. (107)

## **C. Gama-Glutamil Transferase**

A Gama-Glutamil transferase (GGT) é uma glicoproteína membranar que catalisa a transferência de resíduos gama-glutamil do glutatião para receptores peptídicos. Está presente no fígado, rins, pâncreas, baço, intestino, cérebro e coração. (124,125)

O doseamento da GGT é útil no diagnóstico e tratamento de doenças hepatobiliares e na avaliação de pacientes com problemas de alcoolismo. (129)

O teste para a detecção da GGT é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio baseia-se no procedimento descrito por L.M. Shaw. Em que na reação com o substrato sintético (L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilida), a glicilglicina

atua como um recetor de resíduo de  $\gamma$ -glutamil e, com isso, é libertado 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB). O produto libertado tem um máximo de absorção de aproximadamente 400nm. A velocidade da formação é medida fotometricamente de 410 a 478nm como um ensaio cinético de ordem zero. (129)

O valor de referência no adulto é de 8 a 78U/L. (107)

#### **D. Transaminases**

As transaminases ou aminotransferases são enzimas que catalisam a transferência do grupo amina de um  $\alpha$ -aminoácido para um cetoácido. A alanina-aminotransferase (ALT/TGP) está presente essencialmente no fígado e a aspartato-aminotransferase (AST/TGO) está presente em maior quantidade no coração e em menor quantidade no fígado. (124,125)

O doseamento das transaminases é útil no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas e cardíacas. (130,131)

O teste para a deteção das transaminases é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio da ALT baseia-se no procedimento descrito por Wroblewski e LaDue, e o ensaio da AST baseia-se no trabalho de Karmen. A reação é iniciada pela adição de  $\alpha$ -Quetoglutarato como segundo reagente. A concentração de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADH) reduzido é medida pela absorbância de 340 a 410nm, sendo a velocidade de redução da absorbância proporcional à atividade da ALT e da AST. (130,131)

O valor de referência no adulto da ALT é de 10 a 40 U/L e da AST de 15 a 40 U/L. (107)

#### **E. Interpretação**

Inflamações das células hepáticas resultam em elevação na ALT, AST e na bilirrubina, enquanto a inflamação da célula do trato biliar resulta na elevação de FAL, GGT e bilirrubina. (124)

Em casos de obstrução aguda da via biliar principal é observada a elevação da ALT, FAL e GGT. (125)

Uma elevação da AST maior que vinte vezes o limite superior de referência, associado a outros sintomas e sinais de hepatopatia, sugere a presença de hepatite viral aguda. As etiologias menos comuns incluem: congestão hepática passiva grave, cirrose ativa, lesão hepática induzida por abuso de drogas, obstrução intra-hepática atípica e precoce do trato

biliar. Se o nível de ALT estiver consideravelmente menos elevado do que o nível de AST é sugestivo de uma causa não relacionada a hepatite viral. (132)

A GGT encontra-se moderadamente elevada nos casos de hepatite viral e na cirrose hepática. Encontra-se ligeiramente elevada (superior a duas vezes o limite superior do valor de referência) em casos de alcoolismo. (125)

Casos de obstrução extra-hepática do trato biliar costumam apresentar uma elevação de FAL superior a quatro vezes o limite superior do valor de referência; uma elevação da GGT superior a dez vezes o limite superior do valor de referência; e uma elevação da AST menor que dez vezes o limite superior. Espera-se ainda, nesses casos, um nível de bilirrubina sérica superior a 5 mg/100mL. Outras possíveis causas para níveis como este estão relacionadas a icterícias colestatias por abuso de drogas, lesões hepáticas de caráter invasivo, cirrose biliar primária ou colangite esclerosante primária, além de casos de obstrução intra-hepática de várias etiologias. (125,132)

Uma elevação do nível de FAL inferior a três vezes o limite superior do valor de referência, e uma elevação da AST inferior a dez vezes o limite superior é comum em pacientes com hepatopatia, podendo ainda estar relacionado a casos de hepatite viral em remissão, hepatite crônica, mononucleose infecciosa, cirrose ativa, lesão ou disfunção hepática induzida por álcool ou drogas, colecistite aguda, fígado gorduroso grave, cirrose biliar primária, infecção e lesões hepáticas invasivas. Se os níveis de AST ou ALT permanecerem significativamente elevados por mais de seis meses, deve-se considerar a possibilidade de hepatite viral crônica. (132)

Uma elevação da FAL sem aumento da AST, excluindo-se as causas ósseas e não-hepáticas, está relacionada a uma lesão invasiva no fígado. Pode ainda estar relacionado a cirrose biliar primária e fase de cura de hepatopatia anteriormente ativa. (132)

#### **4.2.1.5 Avaliação da Função Renal**

Os rins são os principais reguladores dos fluidos no organismo. Possuem funções importantes como: a manutenção da homeostasia (através da regulação do equilíbrio dos fluidos e eletrólitos do organismo); excreção dos produtos de degradação do metabolismo; e secreção de hormonas. (133)

## **A. Ureia**

A ureia é o principal produto do metabolismo das proteínas. Forma-se no fígado, onde as proteínas são degradadas a aminoácidos, que, por sua vez, sofrem reações de desaminação, formando amónia. A amónia é convertida em ureia para evitar toxicidade, e é excretada no rim. (133)

O doseamento da ureia é útil no diagnóstico e tratamento de: doença renal; obstrução do trato urinário; e insuficiência renal aguda e crónica. (134)

O teste para a deteção da ureia é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro, plasma (heparina de lítio) e urina. O ensaio baseia-se na reação enzimática de Rosh-Ramel, que utiliza urease e glutamato desidrogenase. Inicialmente, a ureia é hidrolisada na presença de água e urease para produzir amónia e dióxido de carbono. Depois, a amónia reage com 2-oxoglutarato na presença de glutamato desidrogenase e nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido (NADH). A oxidação de NADH em nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) oxidado é medida como uma reação inversa a 340 a 410nm. (134)

O valor de referência no adulto da ureia é de 7 a 18 mg/dL. (107)

## **B. Creatinina**

A creatinina é sintetizada no fígado, rins e pâncreas a partir de três aminoácidos: a arginina, glicina e metionina. É eliminada preferencialmente por filtração glomerular, apesar de uma pequena parte ser eliminada por secreção tubular. A sua retenção é, portanto, um índice de insuficiência glomerular. (133)

O doseamento da creatinina é útil no diagnóstico e tratamento de doenças renais e na monitorização da diálise renal. (135)

O teste para a deteção da creatinina é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro, plasma (heparina de lítio) e urina. O ensaio baseia-se na reação de ácido pícrico com creatinina num meio alcalino, conforme descrito no procedimento original de Jaffe. Inicialmente, a creatinina reage com ácido pícrico num meio alcalino para produzir um complexo de creatinina picrato avermelhado. A velocidade da formação do complexo é proporcional à concentração de creatinina, medida de 505 a 571 nm. (135)

O valor de referência no adulto da creatinina é de 0,6 a 1,2 mg/dL. (107)

### C. Clearance da Creatinina

O doseamento da creatinina no sangue, junto ao doseamento da creatinina em urina de 24 horas, permite calcular a clearance da creatinina ( $C_s$ ), que mede o volume de filtrado glomerular formado por minuto. A medição da clearance da creatinina permite avaliar o grau de insuficiência renal. (136)

Para efectuar o cálculo da clearance da creatinina é utilizada a seguinte fórmula:

$$C_s = \frac{(U_s \times V)}{P_s}$$

Onde o  $U_s$  é o valor do doseamento da creatinina na urina de 24 horas,  $V$  é o fluxo urinário em mL/min e o  $P_s$  é o valor do doseamento da creatinina no sangue. (136)

O valor de referência no adulto da clearance de creatinina em homens é de 97 a 137mL/min, e na mulher de 88 a 128mL/min. (107)

### D. Ácido Úrico

O ácido úrico é um produto do catabolismo das purinas adenosina e guanosina. É transportado através do plasma até os rins. Possui um processo de filtração complexo em que há filtração de quase todo o ácido úrico pelo glomérulo, e este é reabsorvido quase totalmente no túbulo proximal. Porém há ainda uma secreção subsequente no lúmen da porção distal do túbulo distal, seguida de reabsorção no túbulo distal. Uma pequena quantidade final é excretada na urina. (133)

O doseamento do ácido úrico é útil no diagnóstico e tratamento de insuficiência renal, gota e eclâmpsia. (137)

O teste para a deteção do ácido úrico é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro, plasma (heparina de lítio) e urina. O ensaio baseia-se na reação enzimática de Fossati. Nessa reação, inicialmente, a auricase converte o ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogénio. Com isso, é formado um composto colorido a partir do peróxido de hidrogénio, 4-aminofenazona e TOOS [N-etil-N-(2- hidróxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina] mediante a influência catalítica de peroxidase. A absorbância do composto é medida como uma reação de ponto final a 545 a 694nm. O nível do composto resultante é diretamente proporcional ao nível de ácido úrico presente na amostra. (137)

O valor de referência no adulto do ácido úrico é de 3,0 a 8,2 mg/dL. (107)

## **E. Microalbuminúria**

A albumina é uma proteína plasmática que é excretada na urina em apenas pequenas quantidades. Esta pequena quantidade na urina é denominada de microalbuminúria e, quando se encontra elevada, indica um possível dano na capacidade de filtração glomerular do rim. (138)

O doseamento da microalbuminúria é útil para a detecção da função renal de pacientes em risco de desenvolver doença renal. (138)

O teste para a detecção da microalbuminúria é realizado no Atellica CH, utilizando como amostra a urina. O ensaio baseia-se no trabalho de Fielding e Hellsing. O ensaio é um método de imunoturbidimetria, em que, através da construção de uma curva padrão a partir das absorbâncias de padrões, determina-se a concentração de albumina da amostra. Inicialmente, a amostra é diluída e depois reage com um antissoro específico para formar um precipitado que pode ser medido de forma turbidimétrica no comprimento de onda de 340 a 596nm. (138)

O valor de referência no adulto da microalbuminúria é <30 mg/dia. (138)

## **F. Interpretação**

A microalbuminúria é um parâmetro muito utilizado no controlo dos doentes com diabetes mellitus, pois estes apresentam um risco elevado de desenvolver nefropatia que, se não tratado, pode evoluir para falência renal. (136)

Em pacientes com glomerulonefrite aguda é possível observar um aumento sérico de ureia e creatina, e uma diminuição rápida da capacidade de filtração glomerular. (136)

Nos casos de doença tubular, ocorre a diminuição da capacidade de reabsorção de compostos específicos, como o ácido úrico, causando assim a hipouricemia. A diminuição da síntese do ácido úrico devido a insuficiência hepática e tratamentos medicamentosos (como o uso de alopurinol), também são causas de hipouricemia. (125,136)

No caso de doenças hereditárias do metabolismo das purinas, como a Síndrome de Lesh-Nyhan, ocorre o aumento da concentração de ácido úrico devido a um défice genético em hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase. Também ocorre o aumento do ácido úrico nos casos de gota, uma doença causada devido à sobreprodução de ácido úrico em decorrência de dietas ricas em purinas ou com consumo excessivo de álcool. O metabolismo aumentado dos ácidos nucleicos também pode ocorrer nos doentes em quimioterapia. (125,136)

Na insuficiência renal aguda, ocorre um aumento dos valores séricos de creatinina em 50% sobre o valor basal, ou uma diminuição de 50% na depuração da creatinina. (136)

Os níveis de filtração glomerular auxiliam na classificação dos estágios da doença renal crônica. Valores superiores a 90 mL/min são considerados normais, classificados como estágio 1. Quando o valor do filtrado glomerular está entre 60 a 89 é considerada uma lesão renal ligeira, classificada como estágio 2. Quando o valor do filtrado glomerular está entre 30 a 50 mL/min é considerada uma diminuição moderada do filtrado glomerular, classificada como estágio 3. Valores entre 15 a 29 mL/min são considerados uma diminuição severa do filtrado glomerular, classificadas como estágio 4. E quando os resultados são inferiores a 15mL/min é considerado uma falha renal, classificada como estágio 5 de doença renal crônica. (136)

#### **4.2.1.6 Avaliação do Equilíbrio Ácido Base**

##### **A. Eletrólitos**

O doseamento dos eletrólitos fornece informações importantes acerca do estado osmótico e de hidratação do organismo. O sódio é o catião mais abundante no meio extracelular e desempenha um papel fundamental na normal distribuição da água e na manutenção da pressão osmótica. O potássio é o catião mais abundante no meio intracelular e desempenha um papel importante no metabolismo celular e no funcionamento celular nervoso e muscular. O cloro é o anião mais abundante no meio extracelular e participa da manutenção da pressão osmótica, da distribuição hídrica e do equilíbrio ácido-base. (139)

O doseamento do sódio é usado no diagnóstico e tratamento de aldosteronismo, diabetes insípida, hipertensão de causa suprarrenal, doença de Addison, desidratação e secreção inadequada de hormonas antidiuréticas. O doseamento do potássio é usado no diagnóstico e tratamento de distúrbios metabólicos e insuficiência renal. O doseamento do cloreto é usado no diagnóstico e tratamento de distúrbios metabólicos, fibrose cística e cetoacidose diabética. (139,140)

O teste para a detecção dos eletrólitos é realizado no Atellica IMT, utiliza como amostra soro, plasma (heparina de lítio) e urina. O ensaio utiliza quatro elétrodos para a medição dos eletrólitos, conforme já descrito anteriormente. (140)

O valor de referência no adulto do sódio é de 135 a 146 mEq/L, do potássio é de 3,5 a 5,0 mEq/L e do cloreto é de 95 a 105 mEq/L. (107)

## **B. Interpretação**

Hipernatrémias podem ser encontradas em doentes com síndrome de Cushing, em casos de desidratação grave, ou quando há ingestão elevada de sal sem ingestão adequada de água. Níveis de sódios superiores a 150mmol/L podem gerar sintomas neurológicos, tremores, irritabilidade, ataxia, confusão e coma. (139)

Hiponatrémias podem indicar o uso excessivo de diuréticos, vômitos prolongados, ingestão insuficiente de sódio ou acidose metabólica. Pode-se observar em utentes com níveis de sódio inferiores a 120mmol/L uma fraqueza generalizada e confusão mental. Níveis de sódio inferiores a 90mmol/L são considerados valores críticos e podem causar danos cerebrais severos. (125,139)

A hiperkaliemia pode ser causada devido a uma baixa excreção renal por conta de insuficiência renal; devido a fármacos inibidores da aldosterona; ou devido a uma transferência de potássio celular para o plasma, por conta de uma acidose metabólica ou destruição celular maciça. (125,139)

A hipocaliemia pode ser causada por: diminuição da ingestão de potássio na dieta; depleção potássica por conta de perdas digestivas ou urinárias; alterações da distribuição intracelular e extracelular por conta de uma alcalose metabólica; terapêuticas com insulina que causam uma mobilização do potássio juntamente com a glicose para dentro das células. (125,139)

A hipercloremia ocorre nos casos de alcalose respiratória e acidoses metabólicas. A hipocloremia ocorre nos casos de acidose respiratória e acidose metabólica. É possível observar que a cloremia aumenta ou diminui proporcionalmente a natremia, concentração do sódio no sangue. (125)

### **4.2.1.7 Avaliação da Função Pancreática**

O pâncreas é a principal fonte de enzimas digestivas. O órgão possui uma porção endócrina e uma porção exócrina. A porção endócrina é composta pelos ilhéus pancreáticos, que são os produtores das hormonas insulina, glucagina e somatostatina. A porção exócrina é constituída por ácinos produtores das enzimas digestivas pancreáticas:  $\alpha$ -amilase, triacilglicerol lipase e diversas proteases. (141)

## **A. Amilase pancreática**

As amilases são um conjunto de enzimas digestivas capazes de hidrolisar as ligações não terminais de polissacáridos de glucose (1,4). Podem ser encontradas no pâncreas, glândulas salivares, intestino delgado, rim, ovários, próstata e pulmões. Para a avaliação da função pancreática, é necessário o doseamento da isoenzima pancreática. (141)

O doseamento da amilase pancreática é útil no diagnóstico e tratamento de distúrbios pancreáticos. (142)

O teste para a detecção da amilase pancreática é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro. O ensaio mede a atividade da amilase pancreática através de isoformas não pancreáticas bloqueadas por anticorpos. Inicialmente, a amilase salivar é inibida através da incubação desta com dois anticorpos monoclonais. Este método utiliza etilideno-*p*-nitrofenil-malto-heptósido como substrato. A amilase pancreática presente na amostra divide o substrato para produzir oligossacarídeos e *p*NP-G2, *p*NP-G3 e *p*NP-G4. É adicionada glucosidase como a enzima indicadora para libertar o *p*-nitrofenol (*p*-NP). O resultado final da hidrólise por amilase e glucosidase é *p*-NP livre, o qual é detetado pela respetiva absorvância de 410 a 694nm. (142)

O valor de referência no adulto da amilase pancreática é de 13 a 53U/L. (142)

## **B. Lípase**

Lípase é uma enzima produzida essencialmente pelo pâncreas, mas também no fígado e estômago. Possui um papel importante na digestão das gorduras, pois catalisa a hidrólise de triglicéridos em diglicéridos e ácidos gordos. (141)

O doseamento da lípase é utilizado no diagnóstico e tratamento de doenças do pâncreas, como a pancreatite aguda e a obstrução do ducto pancreático. (143)

O teste para a detecção da lípase é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e o plasma (heparina de lítio). O ensaio mede a atividade da enzima lípase através da reação enzimática da lípase, produzindo a metilresorufina, que é medida espectrofotometricamente. Inicialmente, o substrato cromogénico da lipase é clivado para formar 1,2-o-dilauril-rac-glicerol e um éster de ácido glutárico. Este decompõe-se espontaneamente numa solução alcalina para formar ácido glutárico e metilresorufina. A metilresorufina é determinada nos comprimentos de onda de 571 a 694nm. (143)

O valor de referência no adulto da lípase é de 12 a 53U/L. (143)

## **C. Interpretação**

A hiperamilasemia é um excelente marcador de pancreatite aguda, apresentando um aumento cinco vezes superior ao valor superior da referência. Ataques agudos de pancreatite crônica, falsos quistos e os cancros do pâncreas provocam também elevações, mas menos pronunciadas. Ocorre também um aumento transicional da amilase após colangiopancreatografia retrógrada endoscópica. (125)

A amilase encontra-se aumentada em duas vezes o valor superior da referência em casos de insuficiência renal. (125)

O aumento da amilasúria ocorre paralelamente ao da amilasemia, mas com um atraso de 8 a 10 horas e com uma duração mais prolongada. O que permite reconhecer as hiperamilasemias transitórias. (125)

A lipase encontra-se elevada nos casos de pancreatite aguda, sendo uma elevação paralela a da amilase, porém mais durável. (125)

### **4.2.1.8 Marcadores de Lesão Muscular**

Quando ocorre uma lesão em algum tecido, enzimas intercelulares são levadas à corrente sanguínea. A detecção da presença de enzimas como a creatina-fosfoquinase, lactato desidrogenase e aspartato transferase é um método para a análise de dano estrutural causado ao tecido musculo esquelético. (144)

#### **A. Creatina-cinase**

A creatina-cinase (CK) catalisa no músculo a transferência de um grupo fosfato da creatina-fosfato para ADP, o que permite a reconstituição das reservas de ATP. A CK é uma enzima dimérica, cujas subunidades M (músculo) e B (cérebro) estão na origem de três isoenzimas: CK-MM (músculo esquelético), CK-BB (cérebro) e CK-MB (miocárdio). (125)

O doseamento da CK é utilizado no diagnóstico de doenças musculares. (145)

O teste para a detecção da CK é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio baseia-se no procedimento modificado de Szasz. Inicialmente, a creatinina quinase reage com creatina fosfato e ADP para formar ATP, que é ligado à reação de hexoquinase-G6PD, gerando NADPH. A concentração de NADPH é medida pelo aumento de absorbância de 340 a 596nm. (145)

O valor de referência da CK, em adultos, é de 25 a 90 U/L nos homens e de 10 a 70 U/L nas mulheres. (107)

## **B. Lactato Desidrogenase**

A Lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão reversível de lactato em piruvato. É um passo essencial nos processos metabólicos, pois produz energia sob a forma de ATP. A LDH é um tetrâmero formado por duas subunidades de dois tipos: H (*Heart*) e M (*Muscle*). As subunidades H são abundantes nos tecidos que consomem lactato, como o coração e o cérebro; e as subunidades M nos órgãos que produzem lactato, como os músculos. (125)

O doseamento da LDH é utilizado no diagnóstico e tratamento do enfarte do miocárdio e enfarte pulmonar. (146)

O teste para a detecção da LDH é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio baseia-se no ensaio de Amador, Dorfman e Wacker. Inicialmente, o lactato desidrogenase catalisa a conversão de L-lactato em piruvato na presença de NAD. A atividade enzimática do LDH é proporcional à velocidade de produção de NADH, que é determinada pela medição do aumento na absorvância de 340 a 410nm. (146)

O valor de referência da LDH, em adultos, é de 45 a 90 U/L. (107)

## **C. Interpretação**

Os níveis de CK encontram-se elevados nos traumatismos musculares; na miosite; na distrofia muscular; após cirurgia; puerpério; após exercícios intenso; e em convulsões. O doseamento de CK também é utilizado no auxílio do diagnóstico precoce de doenças congênitas do musculo esquelético, como: distrofia muscular de Duchenne, e distrofia muscular de Becker. Nesses casos, os níveis de CK encontram-se elevados em dez vezes em relação ao superior do nível normal em fases iniciais. Fases estas em que ainda não se manifestaram sintomas específicos dessas doenças. (144)

A hemólise e a citólise hepática libertam grandes quantidades de LDH. Portanto, os níveis de LDH estarão elevados em anemias hemolíticas intravasculares e nas hepatites. A LDH também se encontra elevada no decurso de linfomas e nos câncros de mama, próstata e do tubo digestivo. (125)

### **4.2.1.9 Avaliação da Função Cardíaca**

O enfarte do miocárdio é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em adultos. O enfarte é um processo em que há necrose como resultado de uma isquemia. Geralmente, são decorrentes de uma aterosclerose, que é um processo inflamatório que

ocorre dentro da parede arterial, na forma de placas de ateroma. Isso leva ao estreitamento do lúmen arterial, resultando na redução da perfusão coronária. (147)

O doseamento das enzimas cardíacas é de suma importância para a confirmação laboratorial do enfarte agudo do miocárdio, principalmente quando os sintomas são atípicos ou mínimos. (144)

### **A. CK-MB**

A CK-MB é um marcador sensível e específico do enfarte agudo do miocárdio. Apresenta um início de elevação entre duas a oito horas após o evento e regressa aos valores normais após 24 a 48 horas. (147)

O teste para a detecção da CK-MB é realizado no Atellica IM, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é um imunoenensaio do tipo sanduíche que recorre à tecnologia quimioluminescente direta, que utiliza quantidades constantes de dois anticorpos: um anticorpo anti-CK-MB, e um anticorpo anti-CK-BB. A quantidade de CK-MB presente na amostra do doente é proporcional à quantidade de unidades de RLU detetadas pelo sistema. (148)

O valor de referência no adulto da CK-MB é inferior a 5,0ng/mL. (148)

### **B. Troponina I**

A troponina é um complexo de proteína contrátil, constituído das subunidades C, T e I. A subunidade C está presente no tecido músculo esquelético; T está presente nas fibras musculares esqueléticas e cardíacas; e I está presente somente no miocárdio. (147)

O doseamento da troponina I é utilizado no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio. (149)

O teste para a detecção da troponina I é realizado no Atellica IM, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é um imunoenensaio em sanduíche, em que o reagente na fase sólida é constituído por partículas magnéticas de látex (conjugadas com estreptavidina) e dois anticorpos monoclonais, cada um reconhecendo um único epítipo da troponina I. A quantidade de troponina I presente na amostra do doente é proporcional à quantidade de unidades de luz relativa (RLU) detetadas pelo sistema. (149)

O valor de referência da troponina I em adultos é de 0 a 2 ng/mL. (107)

### **C. Mioglobina**

A mioglobina é uma hemoproteína intracelular ligada ao oxigénio que pode ser encontrada nos músculos cardíacos e esquelético. Possui uma rápida libertação para a circulação em casos de lesão em tecidos. (150)

O doseamento da mioglobina é utilizado no diagnóstico de doenças da musculatura esquelética, insuficiência renal e miocardite. (150)

O teste para a deteção da mioglobina é realizado no Atellica IM, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio é um imunoensaio do tipo sanduíche, utilizando a tecnologia da quimioluminescente direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo é um anticorpo antimoglobina policlonal e o segundo anticorpo é um anticorpo antimoglobina monoclonal. A quantidade de mioglobina presente na amostra do doente é proporcional a quantidade de RLU detetadas pelo sistema. (150)

O valor de referência da mioglobina em adultos é inferior a 110ng/mL. (150)

### **D. Interpretação**

No enfarte agudo do miocárdio, a CK-MB tem o seu início de elevação entre 2 e 8 horas após o aparecimento da dor torácica. Apresenta o seu pico de concentração depois de 12 a 24 horas e regressa aos valores normais após 24 a 48 horas. Outras causas que podem ocasionar a elevação da CK-MB incluem cirurgia cardíaca de bypass coronário; substituição de válvula ou reparação de dano congénitos; traumatismo do músculo esquelético; dermatomiosite; distrofia muscular de Duchenne; síndrome de Reye; rabdomiólise; overdose de drogas; e intoxicação alcoólica crónica. (144, 148)

A troponina I é um indicador mais específico do enfarte, torna-se elevada dentro de cerca de quatro a seis horas após o início do evento, atinge valores máximos dentro de onze horas e retorna aos valores normais em quatro dias. O acompanhamento de valores seriados de troponina é importante na diferenciação do enfarte agudo do miocárdio e outras possíveis condições como: insuficiência renal, arritmias, embolia pulmonar, doença renal crónica, miocardite e cardiotoxicidade. (144,149)

A mioglobina é libertada na circulação de 2 a 4 horas após o dano celular, atinge o seu pico entre 9 e 12 horas e retorna aos seus valores normais dentro de 24 a 36 horas. Além de traumatismos e doenças isquémicas, outras condições estão associadas a elevação da mioglobina como: distúrbios metabólicos, esforços musculares, inflamação não infecciosa, infeções, febre, certos medicamentos e insuficiência renal. (144, 150)

#### **4.2.1.10 Metabolismo do Ferro**

O ferro circulante no sangue é um equilíbrio entre as reservas do organismo, a absorção alimentar e a hemólise fisiológica. Na alimentação de um adulto, uma média de 10mg/dia de ferro são ingeridos, dos quais 10% são absorvidos. As perdas diárias no homem são em torno de 1mg/dia e nas mulheres o dobro disso. (151)

##### **A. Ferro**

O ferro no estado férrico, ingerido na dieta, é convertido para a forma ferrosa após ingestão e é absorvido no duodeno e no jejuno. (151)

O doseamento do ferro é utilizado no diagnóstico e tratamento de anemias por deficiência de ferro e hemocromatose. (152)

O teste para a detecção do ferro é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio). O ensaio inicia-se com a desagregação do ferro férrico da transferrina, e, num meio ácido, é reduzido à forma ferrosa. O ferro ferroso é assim complexado com ferrozina para produzir um cromóforo colorido, que absorve de 571 a 658nm. (152)

O valor de referência de ferro em adultos é de 50 a 170 µg/dL. (107)

##### **B. Transferrina**

O ferro circula no sangue acoplado a uma beta-globulina, a transferrina. Essa molécula capta o ferro das reservas e liberta-o nos eritroblastos. A síntese da transferrina pelos hepatócitos é inversamente proporcional a quantidade de ferro intracelular. (151)

O doseamento da transferrina é utilizado no diagnóstico de subnutrição, infecção crónica, hepatite aguda, policitemia, anemia perniciosa e anemia por deficiência de ferro. (152)

O teste para a detecção da transferrina é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio e EDTA com potássio). O ensaio é um ensaio imunoturbidimétrico, reforçado por polietilenoglicol. Inicialmente, a amostra é diluída e, em seguida, reage com um antissoro específico para formar um precipitado, que pode ser medido de forma turbidimétrica de 340 a 596nm. (153)

O valor de referência da transferrina, em adultos, é de 215 a 365 mg/dL para homens, e de 250 a 380 mg/dL para mulheres. (153)

### **C. Capacidade total de fixação do ferro**

A capacidade total de fixação do ferro sérico (TIBC) representa uma estimativa aproximada da transferrina sérica, ou uma forma indireta de doseamento da transferrina. (151)

O doseamento da capacidade total de fixação do ferro é utilizado no diagnóstico e tratamento da anemia. (154)

O teste para a detecção da capacidade total de fixação do ferro é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro. No ensaio, inicialmente a amostra é adicionada a um reagente ácido contendo ferro e um corante fixador de ferro. O ferro fixado é libertado, e um segundo reagente neutro é adicionado. A variação no pH permite que o ferro ligue e sature a transferrina da amostra. A redução na absorbância é diretamente proporcional à capacidade de ligação do ferro da amostra. (154)

O valor de referência da capacidade total de fixação do ferro no adulto é de 250 a 425µg/dL. (154)

### **D. Ferritina**

O ferro restante, que não é utilizado pelos precursores eritróides na medula óssea, é armazenado no interior das células reticulares na medula óssea, fígado e baço, sob a forma de ferritina. A ferritina permanece nos tecidos até ser necessária para a eritropoiese. (151,155)

O doseamento da ferritina é utilizado no diagnóstico da anemia por deficiência de ferro e sobrecarga de ferro. (155)

O teste para a detecção da ferritina é realizado no Atellica IM, utiliza como amostra o soro e plasma (heparina de lítio e EDTA). O ensaio é um imunoensaio do tipo sanduíche, efetuado em dois locais, que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, que utiliza quantidades constantes de dois anticorpos antiferritina. O primeiro é um anticorpo antiferritina policlonal marcado com éster de acridina, e o segundo é um anticorpo antiferritina monoclonal ligado por covalência a partículas paramagnéticas. A quantidade de RLU detetada no sistema é proporcional à quantidade de ferritina na amostra. (155)

O valor de referência da ferritina em adultos é de 15 a 200ng/mL nos homens, e de 12 a 150ng/mL nas mulheres (107)

## **E. Interpretação**

A deficiência do ferro pode ser produzida de três maneiras: por ingestão insuficiente de ferro; ferro não disponível para a eritropoiese, apesar de estar em quantidade adequada; e perda aumentada de ferro. (151)

O ferro encontra-se diminuído nos casos de deficiência de ferro; nas anemias ferroprivas; e nas anemias associadas a doenças crônicas graves, como as doenças reumatóides do colágeno, neoplasia maligna extensa, uremia, cirrose e infecção crônica grave. Encontra-se diminuído também em casos de stress grave, como nos casos de cirurgia, infecção, enfarte do miocárdio ou cerebral e no tratamento de anemia megaloblástica. (151)

O ferro encontra-se aumentado no caso de anemia hemolítica, nos casos de sobrecarga de ferro, na estrogénoterapia e na hepatite aguda. Pode ainda estar normal ou aumentado na talassemia menor. (151)

Na gravidez, ocorre um ligeiro aumento de ferro no primeiro trimestre devido ao aumento da transferrina ocasionado pelo aumento do estrogénio. Entretanto, no terceiro trimestre, ocorre uma queda dos níveis de ferro devido à baixa do estrogénio e devido ao aumento de utilização do ferro. (151)

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, por isso, diminui nos casos de doenças agudas e crônicas graves. A redução dos níveis de transferrina acarreta na diminuição da capacidade total de ligação do ferro. Também se encontram diminuídos nos casos de sobrecarga de ferro e hipoproteinemia. A transferrina e a TIBC encontram-se elevadas nos casos de estrogénoterapia, gravidez, alcoolismo e hepatite aguda. (151)

A ferritina, por ser uma proteína de fase aguda positiva, encontra-se elevada em resposta à inflamação aguda, infecção e traumatismo. Também se encontra elevada em pacientes submetidos à transfusão de sangue, na anemia megaloblástica, na anemia hemolítica e na hepatite crônica. A ferritina encontra-se diminuída nos casos de deficiência de ferro. (151)

### **4.2.1.11 Metabolismo Mineral e Ósseo**

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por células e por matriz extracelular. A matriz óssea é um ótimo reservatório de iões minerais do organismo, principalmente cálcio e fósforo. (156)

Existe um mecanismo homeostático para a manutenção das concentrações do cálcio e do fósforo, em que o osso é responsável pelo armazenamento e mobilização; o intestino é

responsável pela absorção; o rim é responsável pela eliminação; e hormonas são responsáveis pela regulação. (156)

## **A. Cálcio**

No organismo, o cálcio apresenta-se de duas formas: na sua forma de stock presente nos ossos; e no plasma sanguíneo, onde pode se encontrar livre na sua forma biologicamente ativa, ou ligado à albumina. (157)

O doseamento do cálcio é utilizado no diagnóstico e tratamento da doença paratiroide, doenças ósseas, insuficiência renal crónica e tetania. (158)

O teste para a deteção do cálcio é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro, plasma (heparina de lítio) e urina. O ensaio baseia-se no uso da *o*-cresolftaleína-complexona sem desproteinização, em que os iões de cálcio formam um composto violeta com *o*-cresolftaleína-complexona num meio alcalino, e a reação é medida de 545 a 658nm. (158)

O valor de referência de cálcio, em adultos, é de 8,4 a 10,2mg/dL. (107)

## **B. Paratormona**

A hormona paratireóidea ou paratormona (PTH) é secretado pelas glândulas paratireoides em resposta a baixas concentrações plasmáticas de cálcio livre. Promove a reabsorção óssea e a reabsorção de cálcio nos túbulos renais, o que previne a sua perda pela urina. (157)

O doseamento da paratormona é utilizado no diagnóstico diferencial de hiperparatiroidismo ou hipoparatiroidismo. (159)

O teste para a deteção da paratormona é realizado no Atellica IM, utiliza como amostra o soro, plasma com EDTA, plasma heparina de lítio e plasma com heparina de sódio. O ensaio é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais, que utiliza a tecnologia quimioluminométrica direta, utilizando quantidades constantes de dois anticorpos anti-humanos da PTH. Sendo, o primeiro, um anticorpo (N-terminal) anti-humano da PTH marcado com éster de acridina, e o segundo um anticorpo (C-terminal) anti-humano da PTH ligado a partículas paramagnéticas de látex revestidas por estreptavidina na fase sólida. A quantidade de unidades de luz relativa detetadas pelo sistema é proporcional a quantidade de PTH na amostra. (159)

O valor de referência da paratormona no soro do adulto é de 18,5 a 88,0 pg/mL, e no plasma de 18,4 a 80,1 pg/mL. (159)

### **C. Vitamina D**

A vitamina D é importante na absorção intestinal do cálcio e na regulação da homeostase do cálcio. É ainda essencial para a formação e manutenção de ossos fortes e saudáveis. (160)

A vitamina D é proveniente de duas fontes: da alimentação e de uma reação com raios UV na pele. Pela alimentação, está presente, dentre outros, em peixes gordos e ovos. Quando sintetizada na pele, é feita a partir do 7-dihidrocolesterol que, através dos raios UV, se torna a pré-vitamina D<sub>3</sub>, que depois de transforma lentamente em vitamina D<sub>3</sub>. A pré-vitamina D<sub>3</sub>, após uma primeira hidroxilação hepática, forma a 25(OH)D e, na segunda hidroxilação renal, forma o seu metabolito ativo a 1,25(OH)D. (156)

Os níveis da forma ativa da vitamina D (a 1,25(OH)D), não fornecem informações fidedignas sobre os níveis de vitamina D. Isso se dá, porque quando ocorre o déficit da vitamina D, a PTH eleva os seus níveis de produção e secreção, aumentando assim a atividade renal da 1 $\alpha$ -hidroxilase, o que promove a conversão da 25(OH)D em 1,25(OH)D. Como a 25(OH)D existe em maior concentração do que a 1,25(OH)D, com o esse aumento da conversão, os níveis de 1,25(OH)D podem ser normais, mesmo em situações de déficit de vitamina D. (156)

O doseamento da vitamina D é utilizado para determinar a suficiência dos níveis de vitamina D. (160)

O teste para a detecção da vitamina D é realizado no Atellica IM, utiliza como amostra o soro, plasma com EDTA, plasma heparina de lítio e plasma com heparina de sódio. O ensaio é um imunoenensaio competitivo que utiliza: um anticorpo antifluoresceína monoclonal de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas; um anticorpo anti-25(OH)vitamina D monoclonal de rato marcado com éster de acridina; e um análogo de vitamina D marcado com fluoresceína. A quantidade de unidades de luz relativa detetadas pelo sistema é inversamente proporcional à quantidade de vitamina D na amostra. (160)

O valor de referência da vitamina D, em adultos, é entre 30 a 100 ng/mL. (160)

### **D. Fósforo**

O fósforo é um importante anião celular e extracelular. Dentro da célula, tem um papel estrutural nos ácidos nucleicos e nos fosfolípidos. Faz parte de estruturas de transferência de energia como ATP e de co-fatores como NAD e NADP. É também um componente integral no metabolismo intermédio dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Participa ainda na concentração muscular e transporte eletrolítico. Fora da célula, é relevante para a

mineralização óssea, dado que as alterações de sua concentração acompanham a deposição do cálcio e a reabsorção óssea. (156, 161)

O doseamento do fósforo é utilizado para diagnóstico e tratamento de doenças renais, disfunções da glândula paratiroide e deficiência de vitamina D. (162)

O teste para a detecção do fósforo inorgânico é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro, plasma (heparina de lítio) e urina. O ensaio baseia-se na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico para formar um composto de fosfomolibdato não reduzido, que é medido como uma reação de ponto final de 340 a 658nm. (162)

O valor de referência do fósforo, para adultos, é entre 3,0 a 4,5 mg/dL. (107)

## **E. Magnésio**

O íon magnésio é o segundo catião intracelular mais abundante no nosso organismo e desempenha um papel importante na ativação de inúmeros complexos enzimáticos. Participa ainda de numerosas etapas da bioquímica intracelular como: glicólise, metabolismo oxidativo e transporte transmembrana do cálcio e potássio. (161)

O doseamento do magnésio é utilizado para diagnóstico e tratamento de hipomagnesemia e hipermagnesemia. (163)

O teste para a detecção do magnésio é realizado no Atellica CH, utiliza como amostra o soro, plasma (heparina de lítio) e urina. O ensaio baseia-se na reação dos íões de magnésio com o azul de xilidil num meio alcalino para formar um composto roxo-avermelhado solúvel em água. O aumento da absorbância é proporcional à concentração de magnésio na amostra e é medido de 505 a 694nm. (163)

O valor de referência do magnésio, em adultos, é entre 1,5 a 2,0 mEq/L. (107)

## **F. Interpretação**

O cálcio encontra-se diminuído nos casos de: hipoparatiroidismo; pseudo-hipoparatiroidismo; na deficiência de vitamina D; na deficiência de magnésio; na doença renal; na síndrome do osso faminto; e em causas mais raras como: cancro; rabdomiólise aguda; pancreatite aguda; intoxicação por etilenoglicol e transplante de medula óssea. (157)

O cálcio encontra-se elevado nos casos de hiperparatiroidismo e cancro. Causas raras como doença renal, doenças granulomatosas, tirotoxicose e terapia com cálcio também podem ser causa de hipercalcemia. (164)

A PTH encontra-se diminuída nos casos de hipoparatiroidismo, e encontra-se elevada nos casos de hiperparatiroidismo. Encontra-se ainda normal ou elevada nos casos de pseudo-hipoparatiroidismo. (125)

A vitamina D encontra-se diminuída nos casos de baixa exposição ao sol, alimentação inadequada, redução de absorção, metabolismo anormal, resistência a vitamina D, cancro, hipertensão arterial, osteoporose e doenças autoimunes. Quando a vitamina D está baixa, a absorção do cálcio é comprometida, o que resulta em uma hipocalcemia. Isso estimula a secreção da PTH que faz baixar a fosforemia. (156)

O fósforo encontra-se baixo nos casos de: hiperparatiroidismo; tratamento de cetoacidose diabética; alcalose; síndrome de realimentação; hipofosfatemia oncogénica; síndrome do osso faminto; e defeito congénito na reabsorção tubular de fósforo. Encontra-se elevado nos casos de insuficiência renal, hipoparatiroidismo, acidose e pseudo-hipoparatiroidismo. (161)

O magnésio encontra-se diminuído nos casos de: dieta insuficiente; má absorção; vômitos; diarreia; diurese osmótica; sucção nasogástrica prolongada; e tratamento com drogas imunossupressoras, como a ciclosporina. Encontra-se elevado nos casos de insuficiência renal. (161)

## **4.2.2 Rapid-Point 500**

### **4.2.2.1 Gasimetria**

A gasimetria arterial é um parâmetro importante para a avaliação dos gases presentes no sangue, como o oxigénio e o gás carbónico. Os principais parâmetros analisados são: o potencial hidrogeniónico (pH), a saturação de oxigénio (SatO<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), pressão parcial (pO<sub>2</sub>), pressão parcial do gás carbónico (pCO<sub>2</sub>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub>), *anion gap* (AG) e lactatos. (165)

O pH é definido como o log negativo da concentração do ião de hidrogénio. Os iões de hidrogénio são produzidos no corpo através da oxidação dos aminoácidos que contêm enxofre. Esses aminoácidos são oriundos das proteínas consumidas na dieta. (165)

A concentração de hidrogénio (H<sup>+</sup>) no sangue é mantida dentro de limites estreitos. Existem três mecanismos que funcionam em conjunto para compensar pequenos desequilíbrios, são eles: sistema tampão, o pulmão e o rim.

O tampão é uma substância capaz de se ligar ao H<sup>+</sup>, capta temporariamente os excessos de H<sup>+</sup>, e posteriormente o organismo elimina-os por excreção renal. As principais

substâncias que atuam como tampões são as proteínas plasmáticas, a hemoglobina, os fosfatos e o sistema de bicarbonato-ácido carbônico. (165,166,167)

O sistema respiratório regula os excessos de  $H^+$  através da libertação ou retenção de  $CO_2$ . A desregulação do sistema respiratório origina: uma acidose respiratória devido a uma hipoventilação e uma acumulação de  $CO_2$ ; ou uma alcalose respiratória devido a hiperventilação e depleção de  $CO_2$ . (165)

O sistema renal possui uma função semelhante à função de regulação do  $H^+$ , pois os dois sistemas não são independentes, mas compensatórios. O sistema renal regula a concentração do  $H^+$  através da eliminação renal de  $H^+$  ou  $HCO_3$ . A acidose metabólica ocorre devido à reduzida secreção de  $H^+$  e reduzida reabsorção de  $HCO_3$ . Por outro lado, a alcalose metabólica ocorre devido à elevada secreção de  $H^+$  e elevada reabsorção de  $HCO_3$ . (165)

A saturação de oxigênio ( $SatO_2$ ) é medida para avaliar a percentagem de oxigênio transportado pela hemoglobina em relação à quantidade total de oxigênio que a hemoglobina pode transportar. (125)

O dióxido de carbono ( $CO_2$ ) é produzido pela respiração celular e é transportado pelo sangue para ser excretado pelos pulmões. O  $CO_2$  é um gás que forma um ácido fraco quando em solução, e tem o potencial de afetar o balanço ácido-base em condições anormais da função respiratória. (165)

A pressão parcial ( $pO_2$ ) corresponde à pressão exercida pelo oxigênio dissolvido no sangue. (168)

A pressão parcial do dióxido de carbono ( $pCO_2$ ) refere-se a pressão parcial do gás  $CO_2$  no plasma. É uma ótima medida da ventilação alveolar, pois o  $CO_2$  se difunde pelas membranas alveolares mais eficientemente do que o oxigênio. Quando a ventilação está alterada a  $pCO_2$  estará elevada. (168)

O bicarbonato ( $HCO_3$ ) é extremamente útil na sua função de tamponamento, pois remove o  $H^+$  em excesso no organismo. É tão fundamental para o tamponamento que pode ser usado como medição do estado ácido-base do organismo, quando avaliado o sistema de bicarbonato do plasma. (165)

O intervalo aniônico, ou *anion gap* (AG), é avaliado de acordo com os resultados dos eletrólitos. É dado pelo cálculo da diferença entre: a soma dos cátions sódio e potássio, e a soma dos aniões, cloreto e bicarbonato. Esse intervalo é uma ferramenta bioquímica utilizada na avaliação de problemas ácido-base, entretanto, não representa um intervalo real. (169)

O lactato é o último produto de degradação anaeróbia da glicose, proveniente da redução do piruvato pela desidrogenase láctica. Ocorre principalmente nos músculos e nas hemácias. O seu doseamento é importante nas hipoxias severas. (125)

Para a realização da gasimetria, é feita uma colheita arterial com seringa heparinizada ou colheita venosa. No laboratório, é utilizado o equipamento RapidPoint 500 - Siemens (figura 15) para a realização das gasimetrias e para doseamentos isolados, como: o doseamento de pH em líquidos biológicos; o doseamento de cálcio ionizado; e o doseamento de lactato.



**Figura 15 - Equipamento de gasimetria RapidPoint 500 (Siemens) [Silvana Agra; 2023]**

O RapidPoint é um analisador *Point-of care* que realiza detecções através de um modulo de medição. O módulo contém sensores planares como um componente único e integrado. O sistema faz uso de eletroquímica, potenciometria, amperometria e condutividade para as medições. Parâmetros como pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, eletrólitos, glicose e lactatos são medidos, ao passo que outros são calculados. (170)

A respeito das medições:

- as medições de pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> e pH são utilizadas no diagnóstico e tratamento de distúrbios de ácido-base;
- as medições de eletrólitos são usadas no diagnóstico e tratamento de desequilíbrios eletrolíticos;
- a medição de cálcio ionizado é utilizada no diagnóstico e tratamento de doença da paratireoide, osteopatias e doença renal crônica;
- o doseamento de lactato auxilia na avaliação do estado ácido-base, gestão de acidose, choque e sépsis. (171)

Os principais valores de referência de gasimetria em sangue arterial são:  $pO_2$  (75 a 105 mm Hg),  $pCO_2$  (33 a 45 mm Hg), pH (7,35 a 7,45) e lactato (4,5 a 14,4 mg/dL). (107)

### 4.2.3 Premier Hb9210

#### 4.2.3.1 Hemoglobina glicada

A medição da hemoglobina glicada ( $HbA_{1c}$ ) é importante na monitorização de diabetes por esta refletir a média glicémica a cerca dos últimos quatro meses. A hemoglobina é constituída por hemoglobina A,  $A_2$  e F. Os percentuais dessa composição são: 97 a 98% de hemoglobina A; 2,5% de hemoglobina  $A_2$ ; e apenas 0,5% de hemoglobina F.

A respeito do processo de glicosilação da hemoglobina, podemos descrever que, quando os eritrócitos são expostos à glicose plasmática, ocorre um fenómeno chamado glicosilação. Esse processo consiste na fixação de uma molécula de glicose ao aminoácido terminal valina da cadeia beta da hemoglobina. Após glicada, a hemoglobina A passa a ser denominada hemoglobina A1. Esta hemoglobina A1 é constituída por três variantes:  $HbA_{1a}$ ,  $HbA_{1b}$  e  $HbA_{1c}$ . A  $HbA_{1c}$  é a mais importante dessas variantes, representando cerca de 80% da hemoglobina A1 total, enquanto as outras duas ( $HbA_{1a}$  e  $HbA_{1b}$ ) juntas compõem menos de 20% da hemoglobina glicada. (172)

Para o doseamento de  $HbA_{1c}$ , o laboratório utiliza o Premier Hb9210 (Figura 16). Este é um equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) de afinidade com boronato. (173)



**Figura 16 - Equipamento Premier Hb9210 - Menarini Diagnostics. [Silvana Agra; 2023]**

A separação por afinidade baseia-se na ligação específica e reversível dos grupos cis-dióis (compostos que apresentam duas hidroxilas no mesmo lado) da molécula de glicose da hemoglobina glicada ao ácido m-aminofenilborônico, na forma de gel, presente na coluna. A hemoglobina glicada liga-se à coluna, enquanto a hemoglobina não glicada (HbA0) é eluída. Um contra-ligante é então utilizado para competir com os locais de ligação, permitindo que a hemoglobina glicada seja eluída da coluna. As frações de hemoglobina são identificadas por um detector de fotodíodo LED com um comprimento de onda único de  $413 \pm 2$  nm. (173)

O valor de referência no adulto é desejável inferior ou igual a 6%. (107)

## 4.2.4 Capillarys 2

### 4.2.4.1 Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas auxilia na triagem de anormalidades das proteínas séricas. O laboratório utiliza o Capillarys Sebia 2 (figura 17) para este fim. Este equipamento utiliza o princípio da eletroforese capilar em solução livre, em que as moléculas com carga são separadas através da sua mobilidade eletroforética a um nível de pH específico e num tampão alcalino. (175)



**Figura 17 - Equipamento Capillarys Sebia 2 [Silvana Agra; 2023]**

A eletroforese das proteínas séricas é um método simples, que permite separar proteínas do plasma humano em seis frações principais: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-1-globulina, beta-2-globulina e gamaglobulina. Além disso, expõe os níveis de concentração dessas proteínas. (174)

Sobre a fração da albumina, é possível identificar a diminuição da concentração de albumina nos casos de desnutrição, gravidez, cirrose hepática, síndrome nefrótica e em consequência de hemorragias e queimaduras. O aumento da albumina ocorre no caso de desidratação. (174)

A fração alfa-1-globulina inclui a proteína alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-fetoproteína e outras proteínas transportadoras. Sobre elas:

- a alfa-1-antitripsina apresenta-se elevada nos casos de inflamações e após administração de estrogénio, e encontra-se diminuída nos casos de doença hepática, doença pulmonar e doença genética recessiva;
- a alfa-1-glicoproteína ácida encontra-se elevada nos casos de inflamação, administração de glucocorticoides e corticosteroides, e encontra-se diminuída nos casos de lesões hepáticas, lesões renais e após administração de estrogénios.
- a alfa-fetoproteína encontra-se elevada nos casos de tumor nos ovários, tumor nos testículos, nos casos de carcinoma hépato celular e do pâncreas. (174)

A fração alfa-2-globulina inclui a haptoglobina, a alfa-2-macroglobulina e a ceruloplasmina. Sobre elas:

- a haptoglobina está elevada nos casos de inflamação, administração de corticosteroides e androgénios, e encontra-se diminuída nos casos de hemólise intravascular, lesão hepática, lesão renal, na malária e na gravidez.
- a alfa-2-macroglobulina está elevada nos casos de lesão renal e após a administração de estrogénio, e encontra-se diminuída nos casos de inflamação e carcinoma da próstata.
- a ceruloplasmina encontra-se elevada na inflamação e após a administração de estrogénio, e encontra-se diminuída nos casos de má nutrição, lesão hepática e doença de Wilson. (174)

A fração beta-globulina inclui a transferrina, beta-lipoproteínas e vários componentes do complemento. Sobre elas:

- a transferrina encontra-se elevada na gravidez, após a administração de estrogénio e nas anemias ferropénicas, e encontra-se diminuída nos casos de lesão hepática, lesão renal, má nutrição e inflamação.
- as beta-lipoproteínas estão elevadas nos casos de inflamação, neoplasia do linfócito B e em rejeição de transplante, e está diminuída nos casos de lesões renais.
- os complementos C3 e C4 encontram-se elevados nas infeções e nas neoplasias, e estão diminuídos nos casos de lesão renal, administração de imunossuppressores, doença genética e em crianças. (174)

A fração das gamaglobulinas é constituída predominantemente do anticorpo IgG enquanto os anticorpos IgA, IgM, IgD e IgE são apresentados na área de junção beta-gama (entre a fração das betaglobulinas e a fração das gamaglobulinas). A concentração das gamaglobulinas está diminuída na presença de hipogamaglobulinemia e agamaglobulinemia, e encontra-se elevada nos casos de infeções, inflamações, neoplasias, mieloma múltiplo e desordens linfoproliferativas. (174)

## 4.2.5 Spectrum Two

### 4.2.5.1 Análise de Cristais

A litíase urinária é uma doença cuja prevalência e incidência tem aumentado ao longo dos anos e está associada a patologias como hipertensão arterial, diabetes, obesidade e síndrome metabólica. Ocorre devido à formação sólida de substâncias que normalmente são filtradas do sangue e excretadas na urina. Essas formações sólidas aglomeram-se e depositam-se no interior dos rins, e com isso, transformam-se em cálculos difíceis de serem dissolvidos e expelidos. (176)

A identificação da composição química do cálculo auxilia no diagnóstico da litíase renal. Para este fim, o laboratório utiliza o Spectrum Two (figura 18), que é um espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O que permite analisar materiais através de técnica não destrutiva. Parte da radiação infravermelha emitida é absorvida pela amostra e parte dela é transmitida, formando uma impressão molecular única. (177)



**Figura 18 -Equipamento Spectrum Two – PerkinElmer. [Silvana Agra; 2023]**

Com os resultados é possível obter a cor, o tipo de corte, a forma, as dimensões e a composição química do cálculo. A composição dos cálculos mais comuns vistos no laboratório durante o estágio foram os cálculos de cálcio e ácido úrico.

## 4.2.6 PlasmaQuant MS

### 4.2.6.1 Análise de Metais

No nosso organismo existem metais que são considerados essenciais para a manutenção de várias funções fisiológicas. Entretanto, alguns destes podem se tornar nocivos

quando atingem certas concentrações limites, enquanto outros que não desempenham quaisquer funções no organismo podem ser considerados tóxicos devido a sua capacidade de doar um ou mais electrões, podendo assim reagir com os sistemas biológicos. (178)

O equipamento PlasmaQuant (figura 19) é utilizado para a deteção de metais em diferentes matrizes biológicas pelo método ICP-MS, espectrometria de massa por plasma individualmente acoplado. A amostra é injetada em um fluxo de plasma, que quebra as ligações químicas e ioniza átomos livres. O feixe de iões é centralizado e enviado para o espectrómetro de massa onde os iões serão detetados como pulsos com base na proporção de sua massa para carga ( $m/z$ ), combinando assim as suas assinaturas com as dos elementos traço. (179)



**Figura 19 - Equipamento Plasma Quant MS - AnalytikJena [Silvana Agra; 2023]**

São realizadas as deteções dos seguintes metais:

- alumínio no plasma e na urina;
- chumbo no sangue e na urina;
- cádmio no sangue e na urina;
- selénio no plasma e na urina;
- mercúrio no sangue total e na urina;
- cobre no plasma e urina;
- zinco no plasma e na urina;
- zinco eritrocitário no sangue total;
- magnésio eritrocitário no sangue total;
- arsénio no sangue e na urina;
- crómio no plasma e na urina;
- iodo no plasma e na urina. (180)

### **4.3 Setor de Genética**

O estágio no setor de genética foi realizado em parte no setor de técnicas especiais na sede da Unilabs, onde é realizada a parte de rastreios pré-natais. E, em parte, no Centro de Genética Clínica (CGC), onde está sediado o setor de genética.

O setor de genética possui cerca de quatro mil testes diferentes, que permitem a prevenção e diagnóstico de doenças hereditárias, cancro e outras doenças através da identificação de alterações num determinado gene ou cromossoma. (181)

Todos os estudos de genética a serem realizados no laboratório são antes verificados pela área de receção e controlo de amostras (ARCA). Ali, verifica-se se estão corretamente registadas as amostras e se dispõem de todos os requisitos necessário para a execução do estudo.

Para os estudos de diagnóstico pré-natal são utilizadas amostras de líquido amniótico, vilosidades coriônicas e amostras de sangue de cordão umbilical. Já para os estudos de oncologia, são utilizadas: amostras de medula óssea; sangue periférico; aspirado ganglionar; amostra de gânglio; amostra de tecido parafinizado; e amostra de células fixadas em tubo ou em lâmina. Já, para os estudos de citogenética convencional são utilizadas: amostras de sangue periférico; biópsias de tecido; tecido resultante de produtos de morte embriofetal; amostras de tecido parafinizado; e amostra de células fixadas em tubo ou em lâmina. (182)

No âmbito do processo analítico, são considerados critérios de rejeição ou interferência das amostras os seguintes parâmetros:

- Amostras de sangue periférico ou medula óssea colhidas em tubos não adequados ao estudo pretendido.
- Amostras em formol, ou outra solução de fixação, para cultura celular.
- Amostras de sangue periférico ou medula óssea hemolisadas.
- Amostras de sangue periférico ou medula óssea coaguladas.
- Amostras com volume / material insuficiente.
- Amostras de DNA que não cumpram os requisitos mínimos definidos para o ensaio.
- Lâminas de citogenética partidas. (182)

#### **4.3.1 Diagnóstico Pré-Natal – DPN**

O rastreio pré-natal de aneuploidia fetal é realizado em grávidas para o rastreio das aneuploidias mais frequentes, como as trissomias dos cromossomas 21, 18 e 13. São ferramentas importantes para oferecer às gestantes um diagnóstico assertivo e seguro. (183)

#### 4.3.1.1 Rastreo Pré-Natal

O rastreo pré-natal é realizado através da ecografia e dos resultados dos doseamentos bioquímicos. Associado a informações como: idade materna; história prévia de aneuploidias; peso; raça; número de fetos; e outros marcadores, permitem o cálculo do risco individual de aneuploidia para cada gestação. Isso é feito através do software LifeCycle. (183)

As amostras utilizadas para a realização dos doseamentos bioquímicos são amostras de sangue seco em cartão, colhidas por punção do dedo. Os doseamentos da BHCG-livre, PAPP, estriol livre, Alfafetoproteína e Inibina A são realizados no equipamento AutoDelfia-PerkinElmer (figura 20). Os ensaios são fluoroimunoensaios de fase sólida de dois locais baseados na técnica direta tipo sandwich. (186)



**Figura 20 - Equipamento AutoDelfia - PerkinElmer. [Silvana Agra; 2023]**

O rastreo do primeiro semestre é realizado entre a oitava e décima terceira semana (mais seis dias) de gestação. Tal rastreo inclui a medição ecográfica da translucência da nuca a partir da décima primeira semana. Para além disso, também inclui o doseamento sérico da fração livre da gonadotrofina coriônica humana (BHCG livre) e a proteína plasmática associada à gravidez (PAPP-A). O comprimento cabeça-nádega do feto, medido no ultrassom, é utilizado como base de cálculo para converter a concentração dos marcadores em um múltiplo da mediana (MoM) ajustados à idade gestacional, etnia, peso da materno e tabagismo. MoM é a medida de quão longe um resultado individual está da mediana. (184,185)

O rastreio do segundo semestre é realizado entre a décima quarta e vigésima segunda semana (mais seis dias) de gestação. Para esse rastreio, são doseados BHCG-livre, PAPP, estriol livre, Alfafetoproteína e Inibina A. A partir da décima quinta semana, o rastreio inclui também o risco para os defeitos do tubo neural. (184)

O rastreio pré-natal também pode ser realizado através de rastreio integrado. Este consiste no rastreio de primeiro trimestre em conjunto com o de segundo semestre para oferecer melhores taxas de detecção. (184)

O resultado do rastreio é apresentado como positivo ou negativo. A determinação dessas duas categorias é feita a partir de um ponto de corte na análise do risco de aneuploidia. Nos casos negativos, é um risco menor do que o ponto de corte, e, por isso, um risco de aneuploidias reduzido; e nos casos positivos, o inverso. (183)

#### **4.3.1.2 Teste Pré-Natal não invasivo**

O teste pré-natal não invasivo (NIPT) é um teste complementar ao rastreio pré-natal, com a vantagem de poder ser feito a partir da décima semana. Para isso, utiliza DNA fetal livre, em circulação no sangue materno, para realizar o rastreio das aneuploidias mais frequentes. São essas aneuploidias: as trissomias dos cromossomas 21(Síndrome de Down), 18 (Síndrome de Edwards) e 13 (Síndrome de Patau); e as alterações numéricas dos cromossomas sexuais (Síndrome de Turner, Síndrome de Klinefelter, Triplo X e Duplo Y). Nesse teste, também é possível identificar o sexo fetal. (183,187)

O teste detecta alterações específicas do DNA fetal através de NGS (sequenciação de nova geração). A técnica NGS, através de genotipagem, usando polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), permite selecionar regiões alvo, amplificá-las e sequenciá-las. É então feita uma comparação entre os fragmentos e calculada assim uma fração fetal, que permite determinar o risco de ocorrência de aneuploidias nos cromossomas em estudo. (188)

A amostra para esse teste consiste de 7 a 10 mL de sangue venoso materno colhidos no tubo Streck. Os resultados são expressos como não detectado e detectado. (189)

#### **4.3.1.3 Teste Pré Natal invasivo**

Quando os resultados dos testes não invasivos são positivos, os resultados são confirmados através de testes de amostras colhidas por técnicas invasivas. As técnicas invasivas, para colheita, são: amniocentese e biópsia de vilosidades coriônicas. As amostras

colhidas são analisadas por QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction) e cariótipo. (189)

A amniocentese é a punção transabdominal do útero para a obtenção do líquido amniótico. Deve ser realizada entre a décima quinta e a décima sétima semana de gestação e carrega o risco de 1% de aborto espontâneo. (185,190,191)

A técnica de biópsia de vilosidades coriônicas deve ser realizada entre a décima primeira e a décima segunda semana de gestação. Também carrega o risco de abortamento espontâneo de aproximadamente 1%. É importante notar que há, no uso dessa técnica, um risco de contaminação da amostra por ocorrência de mosaicismos confinados à placenta, que é uma condição em que há na placenta material genético aneuploide não pertencente ao feto, o que falseia análises citogenéticas no caso de fetos do sexo feminino. (190,191,192)

### **4.3.2 Citogenética**

A área de citogenética estuda a estrutura e organização cromossômica e suas implicações para a saúde. Através do cariótipo humano é possível obter informações acerca do número de cromossomos por célula, da composição dos cromossomos sexuais e também identificar anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais, sejam elas constitucionais ou adquiridas.

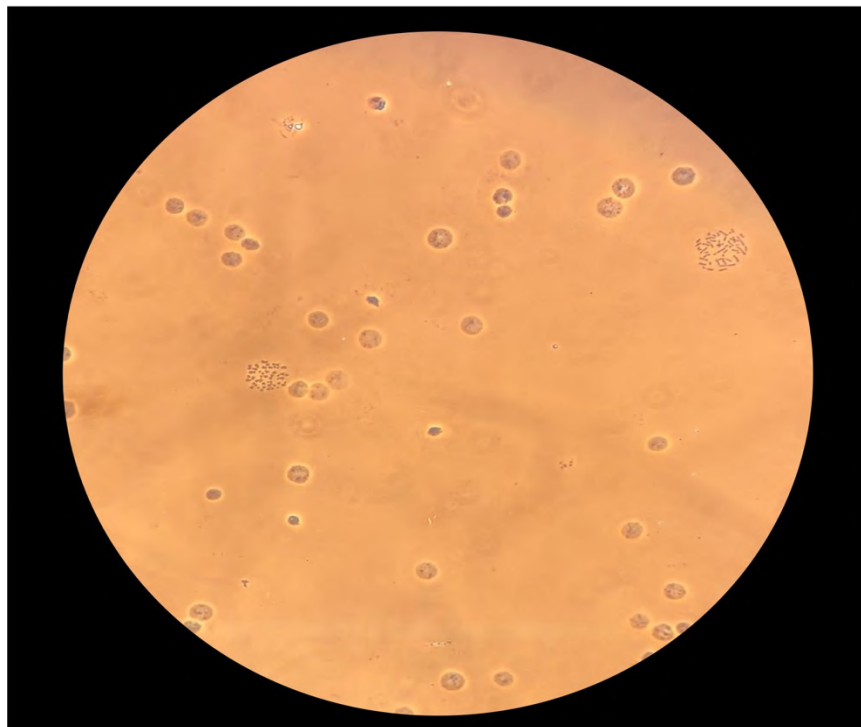
Quando a análise dos cromossomos revela que partes de cromossomos estão perdidas ou há trocas entre partes dos cromossomos, essas podem ser usadas para detectar anormalidades cromossômicas hereditárias.

#### **4.3.2.1 Cariótipo**

A preparação do cariótipo inicia-se com a cultura em tubo (suspensão) de linfócitos. Ao meio de cultura, o RPMI-1640, é adicionado soro bovino fetal e antibiótico/antimicótico. Antes de iniciar a cultura, é determinada a densidade celular da amostra em câmara de Neubauer para determinar o volume de amostra que será utilizado. Para cada amostra é definido o número e tipo de culturas a efectuar, em função do diagnóstico e da densidade celular. (195)

Os cromossomos tornam-se visíveis nas células durante a mitose, especialmente na metáfase, quando atingem seu máximo de condensação. Nessa fase, o centrômero e os dois cromatídeos de cada cromossomo são perfeitamente visíveis ao microscópio óptico. (193)

A mitose é provocada através da adição de um agente mitogénico no meio de cultura. As células são bloqueadas em metáfase através da adição da Colcemid (agente despolimerizante de microtúbulos, o que impede a segregação cromossômica). Após isso, são submetidas a um choque hipotónico através da solução de cloreto de potássio e citrato de sódio à amostra, o que permite que a água entre na célula, turgindo-a para se obter um correto espalhamento dos cromossomas na lâmina. Nesse ponto, adiciona-se o fixador (solução de metanol e ácido glacial) e realiza-se o espalhamento. Assim, preparam-se três lâminas que são observadas sob microscópio de contraste de fase (figura 21) para verificar se há metáfases bem espalhadas e sem citoplasma. (196)



**Figura 21 - Lâmina de Cariótipo para avaliação da qualidade das metáfases. [Silvana Agra; 2023]**

Após a preparação das lâminas, essas são coradas (com bandagem GTG) utilizando tripsina e o Giemsa. As lâminas são examinadas no microscópio óptico. São feitas diversas fotografias dos cromossomas que, através do programa Ikaros (figura 22), são recortados, emparelhados e classificados.



**Figura 22 - Processo de montagem de Cariótipo. [Silvana Agra; 2023]**

A análise e seu resultado são feitas de acordo as diretrizes do laboratório que são baseadas nas atuais diretrizes europeias, americanas e/ou específicas de cada doença. A análise cromossômica inclui a análise mínima de vinte metáfases com contagem e pontuação de cromossomas estruturalmente anormais. E, para cada caso, pelo menos dez metáfases são capturadas e cariotipadas. As imagens captadas são revistas por um segundo técnico. (197,198)

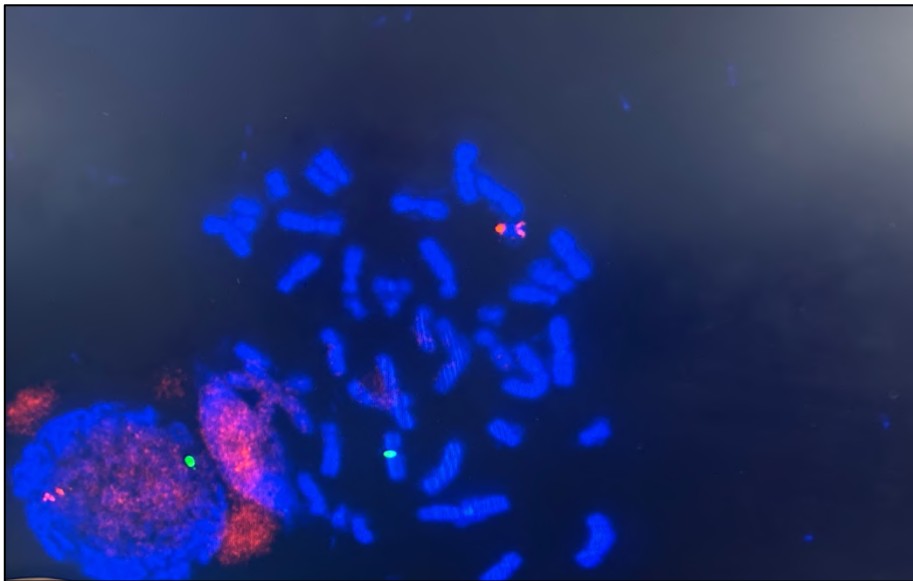
#### **4.3.2.2 FISH**

Contudo, as técnicas da citogenética clássica apresentam uma dependência do crescimento em culturas de células para a obtenção de núcleos em metáfase. Por esse motivo, o estudo de doenças como o Mieloma Múltiplo, por exemplo, é dificultado pelo seu baixo índice mitótico. Além disso, esse conjunto de técnicas se prova ineficaz na detecção de alterações crípticas (como translocação  $t(4;14)(p16;q32)$ ), que recebem esse nome por serem muito subtis e difíceis de detetar pela inspeção microscópica. (199)

Assim, o uso de técnicas moleculares para analisar cromossomas tornou-se amplamente necessário na citogenética, especialmente para a detecção de rearranjos associados a doenças hematológicas, microdeleções/microduplicações, anomalias

estruturais, rearranjos subteloméricos, determinação do sexo e aneuploidias. São algumas dessas técnicas: FISH (Hibridização In Situ Fluorescente), CGH (Hibridização Genômica Comparativa), e NGS.

FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization* é um método que analisa uma região cromossômica específica através de fragmentos de DNA marcados com fluorocromos, sondas, que hibridizam com a amostra de DNA numa lâmina. O FISH pode ser aplicado em células em interfase (núcleos) ou em células em metáfase provenientes de cultura celular. Para isso, a amostra do paciente é colocada numa lâmina e as sondas são aplicadas na região de interesse da lâmina. A amostra é desnaturada para separar as cadeias de DNA, seguida de incubação para hibridização da sonda com a amostra. A análise dos resultados é realizada no microscópio de fluorescência (figura 23), sendo a contagem de sinais FISH variável de acordo com a indicação da análise. O software Metafer é utilizado para contagem de sinais interfásicos. Os resultados constitucionais são emitidos de acordo com a última versão do ISCN. Os resultados onco-hematológicos são emitidos de acordo com as diretrizes internacionais. (200)



**Figura 23 - Imagem de FISH em análise. [Silvana Agra; 2023]**

O FISH pode ser realizado nas amostras oriundas de: sangue periférico; medula óssea; fluido amniótico; vilosidades coriônicas e outros tecidos; sangue fetal; células fixas; cultura de células e blocos e lâminas de parafina. (200)

O uso da combinação de diferentes sondas com diferentes fluorescências permite a detecção de múltiplos alvos na mesma célula e/ou a detecção de rearranjos. As principais

sondas utilizadas são as sondas centroméricas, subteloméricas, painting e para regiões específicas. (200)

As sondas centroméricas têm como alvo a região centromérica de um cromossoma, são utilizadas muitas vezes como controles internos para outras sondagens direcionais a outras regiões. Além de serem utilizadas para detecção de aneuploidias e caracterização de cromossomas marcados. (200)

As sondas subteloméricas possuem como alvo o telômero de um cromossoma e são utilizadas para detecção de rearranjos envolvendo essa região. (200)

As sondas painting são um conjunto de sondas que cobrem um cromossoma inteiro ou braço cromossômico e são utilizados para caracterização de anomalias estruturais. (200)

As sondas para regiões específicas tem como alvo regiões específicas do cromossomas, como regiões de microdeleções/microduplicações recorrentes. (200)

#### **4.3.2.3 MLPA**

O *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) é uma técnica semi-quantitativa utilizada para analisar variações no número de cópias (CNVs) no genoma. Esta técnica determina o número relativo de cópias de até sessenta sequências de DNA em uma única reação baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) multiplex. (201)

O processo começa com a desnaturação da amostra de DNA. Neste passo, uma mistura de sondas de MLPA é adicionada à amostra. Cada sonda consiste em dois oligonucleótidos projetados para hibridar com sequências específicas no DNA-alvo. Durante a subsequente reação de PCR, as sondas ligadas são amplificadas simultaneamente utilizando o mesmo par de primers, resultando na amplificação de um conjunto único de fragmentos de DNA. Um dos primers de PCR é marcado com fluorescência, o que permite a visualização dos produtos de amplificação durante a separação dos fragmentos por eletroforese capilar. (201)

Após a amplificação, um eletroferograma específico da amostra é gerado. Neste eletroferograma, os picos da amostra são comparados com padrões de picos de DNA de referência. Assim, uma diminuição relativa na altura de um pico indica a deleção de uma ou mais sequências-alvo, enquanto um aumento na altura relativa do pico indica um aumento no número de cópias dessas sequências. (201)

#### 4.3.2.4 ARRAY

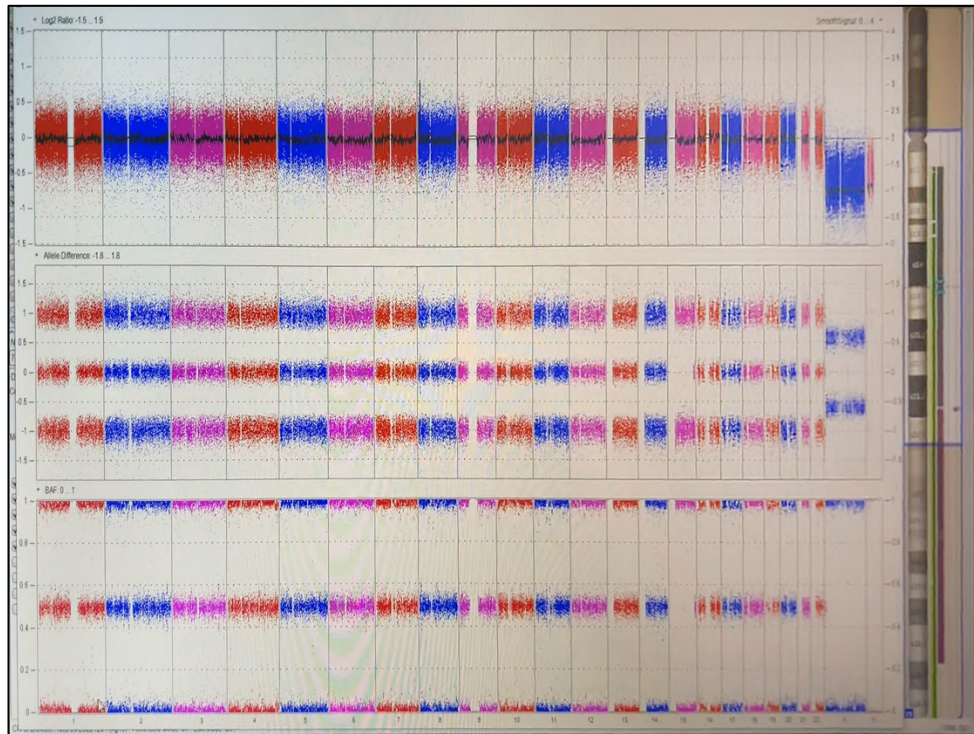
O estudo cromossômico por *array* CGH baseia-se na técnica de hibridação genômica comparativa (CGH). Neste método, o DNA extraído de amostra em estudo é comparado com o DNA de uma amostra normal de referência para detetar regiões com perda ou ganho de material genético. (202)

Para realizar o estudo, podem ser utilizadas várias amostras como DNA, sangue periférico em EDTA, líquido amniótico, células de cultura de líquido amniótico, vilosidades coriônicas ou células de cultura de vilosidades coriônicas. (202)

Inicialmente, o DNA é digerido usando a enzima de restrição Nsp I, que corta o DNA em locais específicos, gerando fragmentos com terminações específicas. Em seguida, o DNA é amplificado por PCR ao longo de toda a sua extensão, utilizando *primers* que se ligam aos adaptadores presentes no DNA. Após a amplificação, o DNA é purificado e tratado com outra enzima de restrição para produzir fragmentos adicionais. (202)

Os fragmentos de DNA fragmentado são então adicionados a um chip (como o chip CytoScan 750K ou HD - Affymetrix®), que contém marcadores das regiões a serem analisadas, correspondendo ao DNA normal de referência. O chip contendo o resultado da hibridação do DNA fragmentado com o DNA de referência é lavado e marcado com fluorescência para análise. O chip marcado com DNA é então lido em um scanner. (202)

Os dados obtidos são coletados em arquivos específicos, que são posteriormente analisados pelo software de análise Affymetrix (ChAS) de acordo com os filtros definidos pelo usuário (figura 24). As variantes são analisadas e classificadas conforme as diretrizes atuais e utilizando bases de dados relevantes para doenças e populações controle. (202)



**Figura 24 - Imagem de Array CGH em análise. [Silvana Agra; 2023]**

### **4.3.3 Análise de fragmentos**

As técnicas que permitem a análise de um determinado fragmento de DNA são fundamentais devido à sua capacidade de caracterizar alelos específicos e detetar mutações associadas a doenças. São amplamente utilizadas em pesquisa genética e diagnóstico clínico avançado para identificar e estudar variações genéticas significativas que podem impactar a fisiologia e patologia humanas. (203)

#### **4.3.3.1 Extração de DNA**

A extração é a primeira etapa, sendo a sua correta execução de extrema importância para as etapas seguintes. São utilizadas amostras de sangue periférico, medula óssea e tecidos. É realizada em uma sala separada, na sala de extração, livre de contaminação de produtos de PCR. (203,204)

O processo de extração de DNA é realizado de forma automatizada utilizando o equipamento QIASymphony- QIAGEN. É uma técnica rápida e eficiente de purificar ácidos nucleicos baseada em sílica com a utilização de partículas magnéticas. Essa metodologia é baseada em quatro passos: lise, ligação do DNA a partículas magnéticas, lavagem e eluição. (204)

Após a extração dos ácidos nucleicos, é realizada uma avaliação de qualidade. Primeiro, mede-se a concentração dos ácidos nucleicos utilizando um espectrofotômetro, com a absorbância a 260 nm, onde um valor de absorbância de 1 corresponde a 50 µg/mL de DNA ou RNA. Em seguida, verifica-se o grau de pureza da amostra calculando a razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm, que deve estar entre 1,7 e 1,9 para ser considerada pura. Quando necessário, também é realizada uma eletroforese em gel de agarose para verificar a integridade da amostra, garantindo que não esteja degradada. (204)

#### 4.3.3.2 PCR

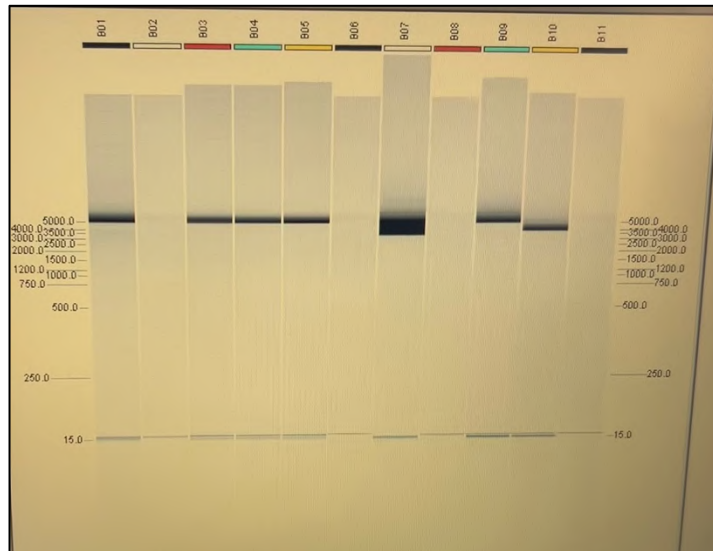
A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, em que uma sequência específica de DNA é amplificada. A síntese é feita pela enzima Taq DNA polimerase, uma enzima termoestável que possui uma actividade de polimerase 5' → 3', bem como de exonuclease 3' → 5', sendo por isso capazes de corrigir pequenos erros de síntese. (203)

O PCR é realizado em uma placa de reação em um termociclador automático, onde ocorrem três passos importantes: desnaturação, emparelhamento e extensão, cada um com uma temperatura definida e que são repetidos em média durante 30 a 40 ciclos. (203)

Na desnaturação, devido ao aumento da temperatura, ocorre o rompimento das pontes de hidrogénio e as duas hélices de DNA separam-se em duas cadeias simples. Em seguida, a temperatura diminui permitindo o emparelhamento dos *primers* com o DNA alvo. (203)

Na extensão, a temperatura é elevada para que ocorra a síntese de DNA. Inicia-se pelo reconhecimento dos *primers* pela Taq DNA polimerase que catalisa a ligação complementar dos desoxinucleotídeos livres à cadeia molde. Desta forma obtêm-se novamente cadeias duplas de DNA. Uma nova desnaturação ocorre por conta de um aumento da temperatura e o ciclo prossegue como descrito, repetindo-se. O DNA adicionado à mistura reacional serve como molde para a síntese de novas cadeias, e essas novas cadeias, à medida que são sintetizadas em cada ciclo, também podem servir como molde para a síntese de outras novas cadeias. (203)

A análise dos resultados é feita por eletroforese automática utilizando o equipamento Qiaxcel, permitindo de forma simples e rápida a separação e a visualização dos fragmentos de DNA (figura 25). (203)



**Figura 25 - Visualização dos fragmentos em eletroforese. [Silvana Agra; 2023]**

A sensibilidade da reação de PCR depende de fatores como a especificidade dos *primers*, temperatura, condições químicas da reação e a qualidade da amostra. (203)

## 5 Controlo de Qualidade

O laboratório UNILABS possui um sistema de gestão de qualidade que monitoriza e controla a qualidade em todas as fases do processo da análise. O sistema de gestão da qualidade utiliza a abordagem PDCA para o planeamento dos processos. Atualmente, o laboratório é certificado pela norma NP EN ISO 9001:2015, acreditado pela NP EN ISO 15189:2014 e o setor de genética é acrescido ainda da certificação CLIA. O laboratório segue ainda as normas e leis vigentes para laboratório clínico. (4)

O laboratório possui documentos que padronizam todas as análises que são realizadas. Possui uma política de educação continuada, em que mantém os seus colaboradores em aprendizagem contínua. Monitoriza indicadores de qualidade para basear as ações de melhoria. Realiza periodicamente auditorias internas e recebe auditorias externas para a verificação dos cumprimentos dos procedimentos e normas. (5)

Possui espaços físicos limpos e que atendem os requisitos legais para a execução das técnicas que são realizadas no espaço. Mantém os equipamentos monitorizados e com as manutenções em dia, de acordo com os manuais do equipamento. Possui reagentes rastreáveis e utilizados de acordo com a bula do fabricante. Para além disso, monitoriza os controlos internos e conta com as avaliações externas do setor de qualidade para garantir a qualidade do serviço prestado. (5)

### 5.1 Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno é baseado na utilização de amostras de valor conhecido, a partir das quais são doseados os diversos parâmetros nas mesmas condições das restantes amostras. Os níveis de concentração dos materiais de controlo utilizados, bem como a frequência de execução, vão de encontro às especificações das metodologias utilizadas. (5)

O controlo de qualidade interno no setor de microbiologia consiste na utilização de estirpes padrão de bactérias (ATCC) para a verificação de todas as técnicas realizadas e dos novos lotes de materiais utilizados. Para os testes rápidos é utilizado o controlo positivo e negativo do fabricante realizado na abertura de cada novo lote. Os registos são realizados em folhas de registo padrão e arquivados no software InnovWay.

O controlo de qualidade interno do setor de bioquímica consiste na utilização de níveis de controlo comercial que são monitorados através do software Unity. Através do software, é possível monitorar os resultados da corrida analítica no gráfico de Levey-Jennings. Podendo assim realizar calibrações quando se faz necessário.

O controlo interno no setor de genética consiste na análise de amostras padrões realizada de forma independente pelos técnicos de cada área, sendo os resultados registados em registo padrão. Para cada reação de PCR são utilizados controlos negativos no ensaio. Na eletroforese é utilizado controlo negativo acrescido também do controlo de avaliação da intensidade do sinal obtido. No caso da técnica de MLPA as probemixes MLPA contêm fragmentos de controlo de qualidade que indicam a existência de problemas que podem afetar os resultados.

## **5.2 Avaliação Externa da Qualidade**

O laboratório participa de comparações interlaboratoriais, através da avaliação externa da qualidade. Participa dos programas RIQAS (*Randox International Quality Assessment Sample*), do UK-NEQAS (*National External Quality Assessment Scheme*) e do GENQA (*Genomics Quality Assessment*).

Os programas de avaliação externa da qualidade constituem desafios clinicamente relevantes que reproduzem amostras de clientes. Com efeito, servem de avaliação para todo o sistema analítico. Os resultados da avaliação externa da qualidade são monitorizados e, quando necessário, são implementadas ações corretivas quando os critérios estabelecidos não são cumpridos. (5)

Para os testes em que não esteja disponível um programa formal de comparação interlaboratorial, o laboratório utiliza materiais a analisar provenientes do exterior, como a troca de amostras com outros laboratórios. (5)

## 6 Fase Pós-analítica

Após a conclusão da fase analítica, dá-se lugar à fase pós-analítica, que é o produto final do laboratório, em que todo o serviço prestado e todas as fases do processo serão expressos na forma de boletim de resultado.

Compreende-se por fase pós-analítica a validação dos resultados, a emissão do boletim dos resultados e a entrega dos resultados ao doente ou médico. (205)

A validação biopatológica tem como função avaliar o resultado obtido daquela análise juntamente com outros resultados que tenha de outros setores, levando em consideração as informações clínicas do doente e os resultados anteriores conhecidos ou apurados. Com isso, é possível estipular se aquele resultado foi obtido respeitando condições técnicas satisfatórias, e, com isso, podem ser assinados, ou se necessitam de uma confirmação de resultado na mesma amostra, ou através de uma repetição de colheita. (205)

Além da qualidade dos resultados validados, o boletim analítico precisa ser compreensível e conter elementos fundamentais como: a identificação do laboratório; a identificação do diretor técnico; os dados completos do utente em todas as páginas; o número de páginas em relação ao número total de páginas; a data da emissão do boletim; identificação do clínico prescriptor; identificação de quem o validou; o tipo de amostra; o método laboratorial utilizado; os valores de referencia biológica; e os resultados obtidos devem ser expressos em unidades SI, ou rastreáveis ao SI. (205)

As entregas do boletim de resultados podem ser realizadas diretamente ao médico ou ao próprio doente de forma presencial ou por e-mail. (205)

## 7 Conclusões

A realização do estágio curricular dentro do curso de mestrado de análises clínicas demonstrou ser uma excelente ferramenta para solidificar os conhecimentos adquiridos durante o curso, além de proporcionar uma experiência prática em um ambiente profissional.

O estágio no laboratório UNILABS Porto foi, em todo, uma experiência extremamente enriquecedora. Por se tratar de um laboratório de grande porte, foi possível adquirir experiência em setores antes desconhecidos, como o setor de técnicas especiais e o setor de genética, permitindo acesso a equipamentos inéditos e novos protocolos, que puderam ser praticados.

Além dos setores de microbiologia, bioquímica e genética, foi possível conhecer todos os setores do laboratório e, com isso, acompanhar uma amostra desde a colheita, triagem, a realização da análise no seu respectivo setor e a sua validação.

O estágio contribuiu significativamente para o direcionamento dos interesses futuros. O contato com um setor dedicado à genética despertou um grande interesse pela área, o que enseja aprofundamento futuro em uma área em rápida evolução.

## **SEGUNDA PARTE – MONOGRAFIA**

# 1 Introdução

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) referem-se a um grupo heterogêneo de doenças que têm origem numa célula progenitora hematopoiética multipotente em que ocorre proliferação clonal da linhagem mieloide sem displasia significativa e com tendência para hematopoiese extramedular. (206)

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*), as NMP englobam as seguintes doenças: leucemia mieloide crónica, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária, leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil e neoplasia mieloproliferativa não especificada de outra forma. São divididas em dois grupos: NMP *BCR::ABL1* positivas, que inclui somente a leucemia mieloide crónica (LMC); e NMP *BCR::ABL1* negativas, onde se incluem as demais neoplasias mieloproliferativas. (207)

O diagnóstico diferencial das NMP *BCR::ABL1* negativas depende das características clínicas e dos diagnósticos hematológico e molecular. A policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária compartilham muitas características relacionadas às disfunções celulares das células hematopoiéticas. As mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR* são as mais frequentes quando se trata destas doenças. (207)

Já a leucemia neutrofílica crónica é caracterizada por leucocitose e hiper celularidade da medula óssea com predomínio de neutrofilia, verificando-se uma associação com mutações no gene *CSF3R* e ausência do cromossoma Philadelphia. Em contraste, a leucemia eosinofílica crónica é caracterizada pela hipereosinofilia persistente no sangue periférico, aumento de blastos na medula óssea ou no sangue, ausência do cromossoma Philadelphia e a presença de uma anormalidade citogenética clonal. A leucemia mielomonocítica juvenil é caracterizada pela ativação descontrolada da via RAS. As neoplasias mieloproliferativas não especificadas de outra forma, são um grupo de neoplasias semelhantes às neoplasias mieloproliferativas, porém não podem ser claramente classificadas como sendo de um dos subgrupos. (207)

Os atributos clínicos (características gerais da doença) e biológicos (fusões e mutações genéticas), tornaram possível a compreensão da patogénese nas neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas. As novas ferramentas de diagnóstico molecular permitem aprimorar a classificação e diagnóstico das NMP, expandindo os horizontes de tratamento, o que é vital dada a propensão à transformação fibrótica e leucémica das NMP. (207)

## 2 Objetivos

As neoplasias mieloproliferativas são um grupo heterogéneo de doenças com características clínicas, fisiopatológicas e genéticas distintas, que ainda não se encontram totalmente esclarecidas. É de suma importância, que o diagnóstico molecular se desenvolva e contribua para a elucidação dos mecanismos da doença, pois constitui a única forma de ampliar o panorama de terapias alvo moleculares.

A presente monografia tem como objetivo geral, fornecer uma revisão no âmbito do diagnóstico laboratorial, principalmente do diagnóstico hematológico e molecular das NMP, apresentando como objetivos específicos:

- Descrever a etiologia das NMP;
- Descrever as alterações genéticas das NMP;
- Abordar a epidemiologia das NMP;
- Caracterizar a Policitemia vera;
- Caracterizar a Trombocitemia essencial;
- Caracterizar a Mielofibrose primária;
- Caracterizar a Leucemia neutrofilica crónica;
- Caracterizar a Leucemia eosinofílica crónica;
- Caracterizar a Leucemia mielomonocítica juvenil;
- Caracterizar a Neoplasia mieloproliferativa não especificada de outra forma;
- Abordar os critérios de diagnóstico estabelecidos pela WHO;
- Descrever os diagnósticos hematológicos das NMP;
- Descrever os diagnósticos moleculares das NMP.

# 3 Neoplasias mieloproliferativas

## 3.1 Neoplasias hematológicas

A hematopoiese (figura 26), é o nome que se dá ao processo responsável pela produção contínua e regulada dos elementos celulares do sangue. As diferentes linhagens hematopoiéticas originam-se de uma célula indiferenciada pluripotente, denominada célula estaminal hematopoiética. (208)

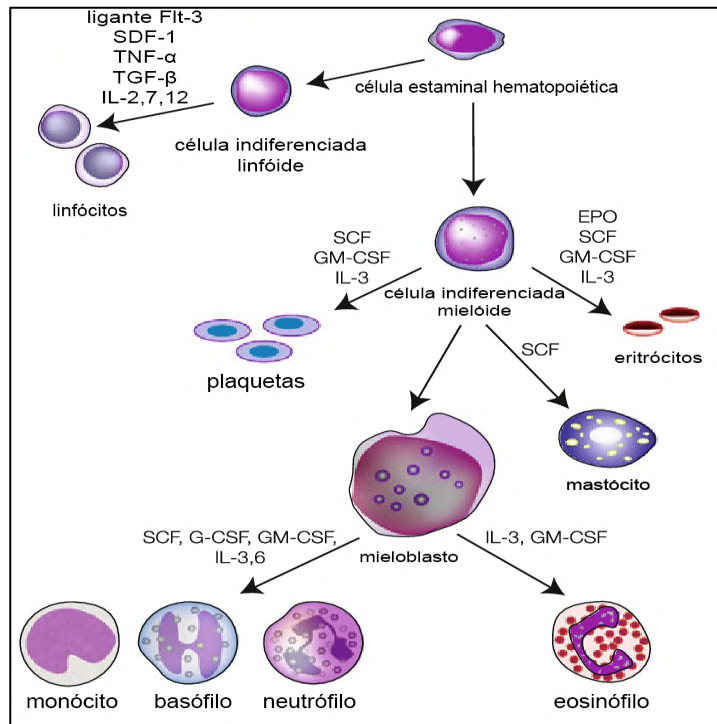


Figura 26 - Esquema da hematopoiese. [Adaptado de (209)]

Nos adultos a hematopoiese acontece essencialmente na medula óssea e regula as várias etapas de produção, diferenciação e maturação celular. Vários genes reguladores da produção estão envolvidos no controlo da hematopoiese, tanto fatores estimuladores, quanto inibidores. (208)

Os fatores estimuladores incluem, por exemplo, fatores estimuladores de colónias (CSF; *colony stimulating factors*), a eritropoietina (EPO) e a trombopoietina (TPO). Os fatores inibidores incluem fatores de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ), a lactoferrina, a prostaglandina E e os interferons IFN-  $\alpha$ /IFN-  $\gamma$ . Outras substâncias são capazes de controlar a capacidade de autorrenovação das células estaminais, como as interleucinas (IL), *stem cells factor* e CSF. (208)

A desregulação da hematopoiese é ocasionada por desordens genéticas, que resultam no desenvolvimento de neoplasias hematológicas. As neoplasias hematológicas são classificadas de acordo com a linhagem e o grau de diferenciação das suas células precursoras. Quanto ao grau, podem ser classificadas em agudas e crônicas. Quanto à linhagem, podem ser de origem linfóide ou mieloide. As neoplasias mielóides podem, ainda, ser subdivididas em leucemia mieloide aguda, neoplasias mieloproliferativas, neoplasias mielodisplásicas e neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas. (210)

As neoplasias mieloproliferativas (figura 27) são um conjunto de doenças em que ocorre a proliferação excessiva de uma ou mais linhagens mielóides; ou a sua não divisão, devido a um excessivo crescimento de tecido fibroso. (210)

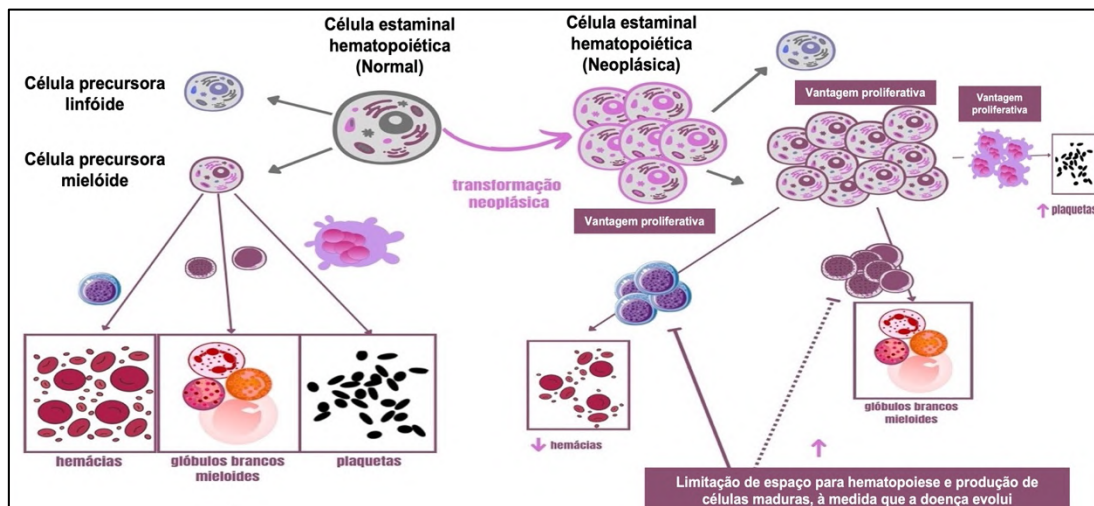


Figura 27- Esquema das Neoplasias Mieloproliferativas. [Adaptado de (211)]

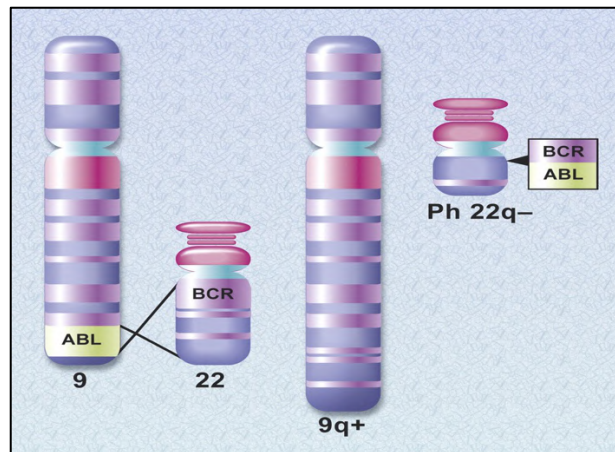
### 3.2 Distúrbios genéticos das NMP

A transformação clonal da célula estaminal hematopoiética de linhagem mieloide, que origina as neoplasias mieloproliferativas, ocorre devido a alterações genéticas adquiridas. Destacam-se como principais desregulações o gene de fusão *BCR::ABL1* e mutações somáticas nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*. (212)

Essas alterações genéticas culminam na ativação constitutiva das vias de transdução de sinal da hematopoiese, causando a proliferação anormal e acúmulo de células maduras de uma ou mais linhagens hematopoiéticas. (212)

### 3.2.1 Gene *BCR::ABL*

O gene de fusão *BCR::ABL1* (figura 28), ocorre devido a uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, t(9;22)(q34;q11), durante a divisão celular, na medula óssea. A quebra dos cromossomas ocorre e os fragmentos quebrados rearranjam-se de forma incorreta, dando origem ao gene *BCR::ABL1*, também denominado de cromossoma Philadelphia (Ph). Foi denominado de Philadelphia devido à sua descoberta ter ocorrido num instituto em Philadelphia. (213)



**Figura 28 - Representação da translocação do gene *BCR::ABL1* [Adaptado de (214)]**

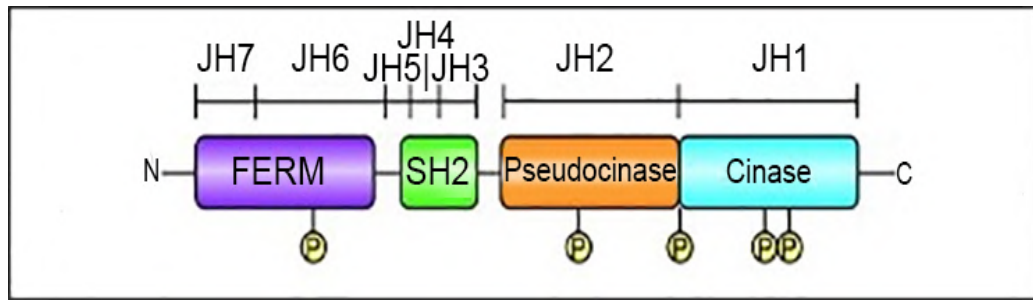
O gene *BCR* (*breakpoint cluster region*) está localizado no cromossomo 22 e gera a proteína BCR, responsável pela regulação do processo de sinalização e divisão celular. O gene *ABL1* (*Abelson leukemia gene*) é assim designado devido ao sobrenome do cientista que o descobriu, Helbert Abelson. O gene *ABL1* está localizado no cromossoma 9 e gera a proteína tirosina cinase ABL, responsável pela regulação do ciclo celular. (213)

O gene de fusão *BCR::ABL1* gera a produção de uma proteína anormal, a enzima BCR-ABL tirosina cinase. A sua atividade aumentada implica a fosforilação de vários substratos, ativando cascatas de transdução de sinal que afetam a proliferação celular. Causa, ainda, a diminuição da dependência do fator de crescimento e diminuição da apoptose das células mieloides. (214,215)

### 3.2.2 Mutações no gene *JAK2*

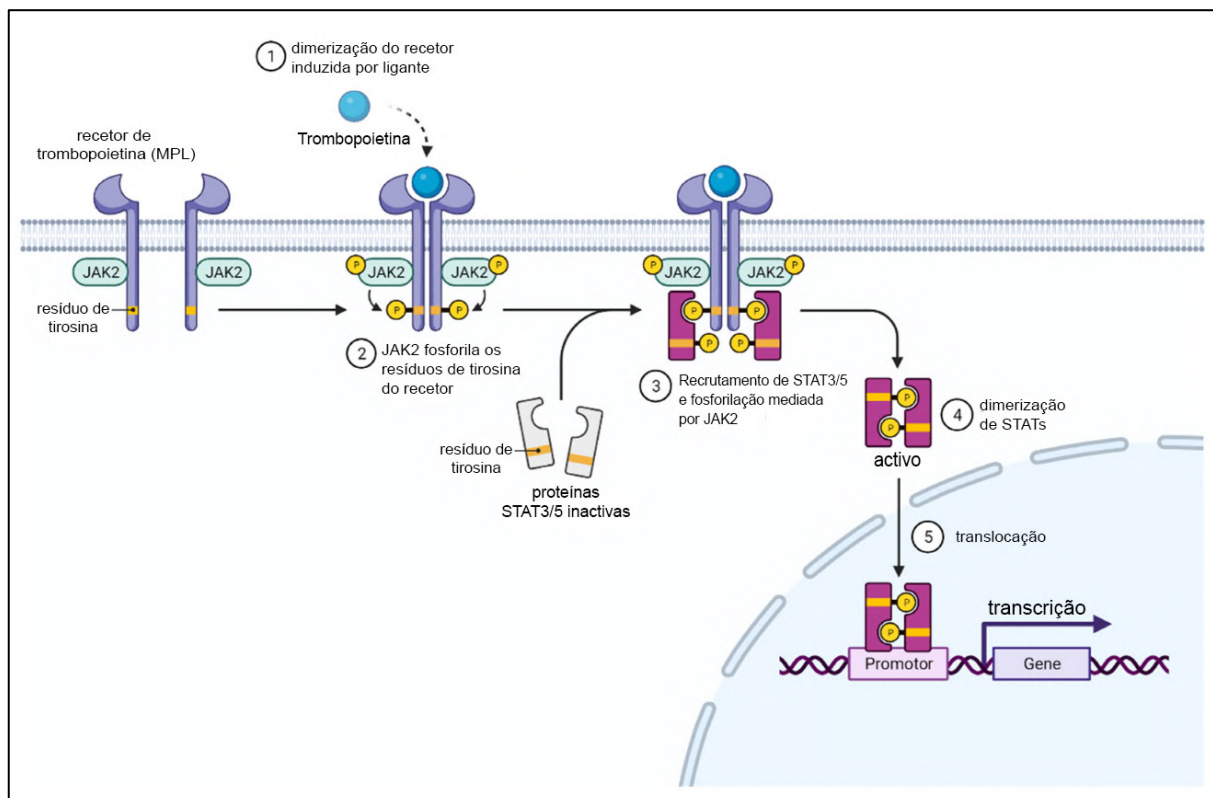
O gene *JAK2* possui 25 exões e está localizado no cromossoma 9p24 e codifica a proteína JAK2, proteína pertencente da família de enzimas janus cinases. A família JAK é composta de JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 (tirosina cinase 2). A JAK2 é uma proteína importante na sinalização intermediária da hematopoiese, sendo fosforilada em resposta a ação de citocinas. A proteína possui sete domínios (figura 29), dentre eles o domínio JH1, que possui

atividade enzimática e o domínio JH2 que não possui atividade enzimática, sendo um regulador negativo da atividade da cinase. (216,217,218)



**Figura 29 - Domínios das JAKs [Adaptado de (217)]**

Em condições normais, o mecanismo de sinalização celular ocorre por ação de fatores de crescimento, que estimulam o crescimento e proliferação da linhagem mieloide. Na via de sinalização JAK-STAT (figura 30), *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*, esse estímulo acontece quando uma citocina ou hormona se liga a um recetor de membrana na superfície da célula, ativando assim a JAK2. (219)



**Figura 30 - Via de sinalização JAK-STAT nas NMP. [Adaptado de (219)]**

A JAK2 promove a fosforilação do recetor e cria sítios de ligação aos fatores de transcrição STAT (*signal transducers and activators of transcription*). A JAK2 promove também a fosforilação de um resíduo específico de tirosina, que vai dissociar os dímeros de STAT, os quais vão migrar até o núcleo da célula, ligar-se a regiões promotoras e ativar a transcrição específica de genes. (219)

Várias mutações no gene *JAK2* têm sido descritas, nomeadamente nos exões 12, 13, 14 e 15. Para as NMP a mutação predominante é a mutação V617F, seguida de mutações menos comuns, como as mutações no exão 12. (220)

### 3.2.2.1 A mutação V617F

A mutação V617F no gene *JAK2* (figura 31) ocorre devido a troca de uma guanina por uma timina na posição 1849 do exão 14 do gene *JAK2* (c.1849G>T), que resulta na substituição do aminoácido valina por fenilalanina no codão 617 da proteína. Essa fenilalanina, resultante da mutação, encontra-se situada no domínio JH2 da proteína *JAK2*, por consequência, a função inibitória do domínio JH2 sobre o JH1 é anulado, resultando num estado constitutivamente ativado do domínio JH1 que, independentemente de fatores de crescimento hematopoiéticos, estimulará as vias de sinalização, como a JAK-STAT, PI3K (*Fosfatidil-Inositol Quinase 3*) e RAS-MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). Gera-se, assim, um fenótipo hiperproliferativo. (216,217,221,222)

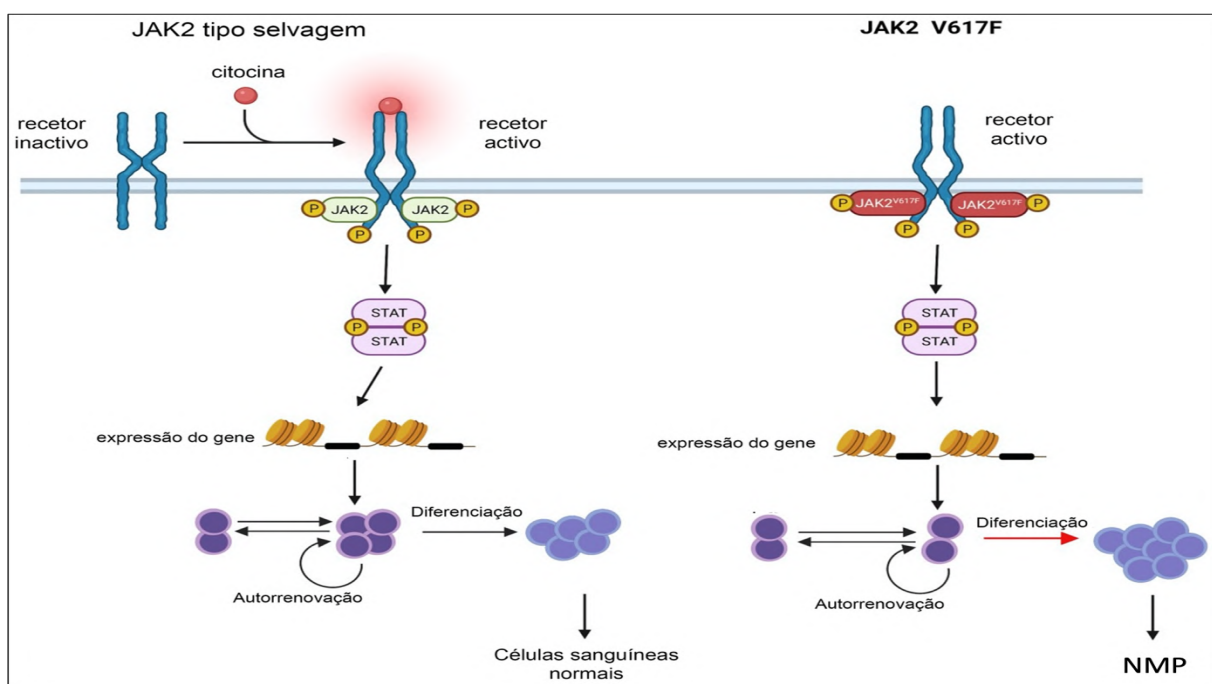


Figura 31 - Mutação V617F no gene *JAK2*. [Adaptado de (222)]

A mutação V617F pode ocorrer tanto num padrão heterozigótico como homozigótico. As células heterozigóticas para a mutação V617F apresentam vantagem proliferativa em relação as células com, apenas, o alelo selvagem. Quando ocorre uma recombinação mitótica entre as regiões homólogas de dois cromossomas 9 numa célula heterozigótica para V617 ocorre a perda da heterozigotia (*Loss of heterozygosity* – LOH) de 9p (9pLOH). Diferentes fenótipos da doença estão relacionados a homozigotia ou a heterozigotia para a mutação V617F. (223, 224)

### 3.2.2.2 Mutações no exão 12

As mutações no exão 12 (figura 32) do gene *JAK2* são mutações somáticas que estão presentes em heterozigotia. Incluem mutações de substituição, deleções e duplicações de aminoácidos que afetam os códãos 533 a 547. (225,226)

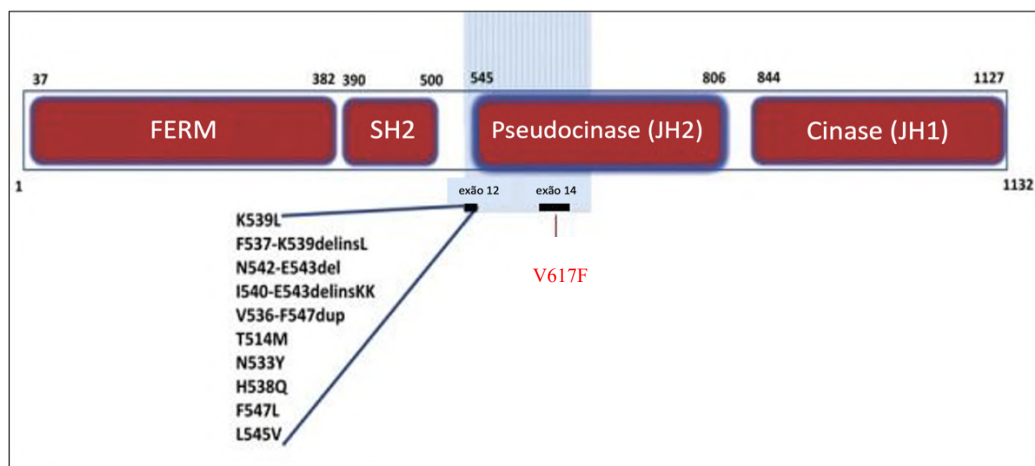


Figura 32 - Mutações no exão 12 do gene *JAK2*. [Adaptado de (224)]

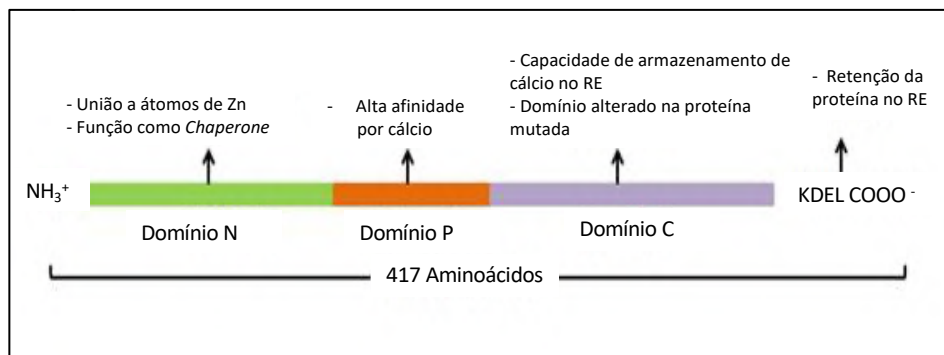
Destaca-se como a mais frequente a mutação p.N542\_E543del, uma deleção, no quadro, de seis nucleótidos nos codões 542 e 543. Estas mutações causam a desregulação da via de sinalização JAK2-STAT por interferirem na função inibitória do domínio JH2 sobre o JH1. (225,226)

### 3.2.3 Mutações no gene *CALR*

O gene *CALR* está localizado no cromossoma 19 (19p13.2) e possui 9 exões. Codifica uma proteína *chaperone*, a Calreticulina, que se encontra presente no reticulo endoplasmático de todas as células nucleadas e possui diversas funções. Quando localizada no retículo endoplasmático, auxilia na regulação estrutural das proteínas recém-sintetizadas e na

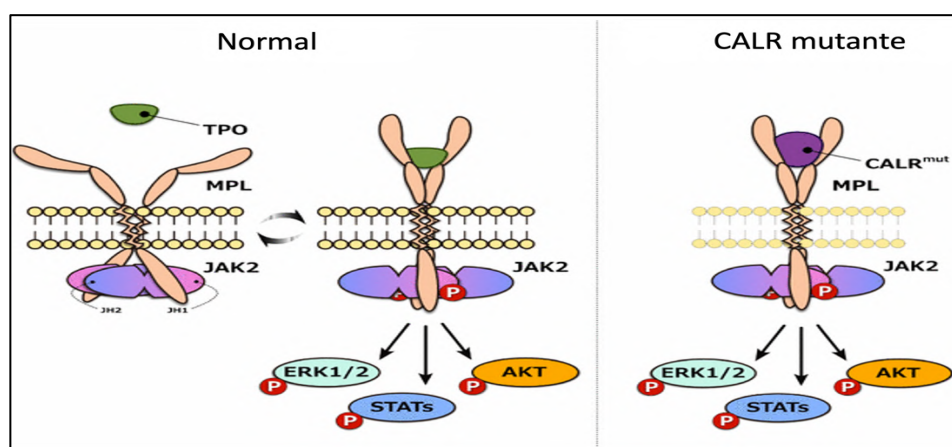
regulação dos níveis de cálcio. Quando localizada na superfície celular e no compartimento extracelular, está envolvida em várias vias de sinalização e auxilia na proliferação e apoptose celular. (227,228)

A Calreticulina possui três domínios (figura 33), o domínio N-terminal, domínio-P e domínio C-terminal. O domínio C-terminal possui uma sequência sinal de aminoácidos KDEL (Lisina, aspartato, glutamato e leucina), que evita a secreção da proteína do retículo endoplasmático. (227)



**Figura 33 - Domínios da Calreticulina [Adaptado de (228)]**

As mutações somáticas no exão 9 do gene *CALR* podem ser inserções ou deleções de pares de bases e resultam na perda do sítio de ligação ao cálcio iônico e a perda da região KDEL, gerando um novo C-terminal mutante, carregado positivamente. A proteína mutante é capaz de ativar a via JAK2-STAT (figura 34), sendo capaz de se ligar ao resíduo N-glicosilado do domínio extracelular do recetor de trombopoietina no retículo endoplasmático, levando à sua ativação. (227,229,230)



**Figura 34 - Ativação da via JAK2-STAT pela proteína CALR mutante. [Adaptado de (230)]**

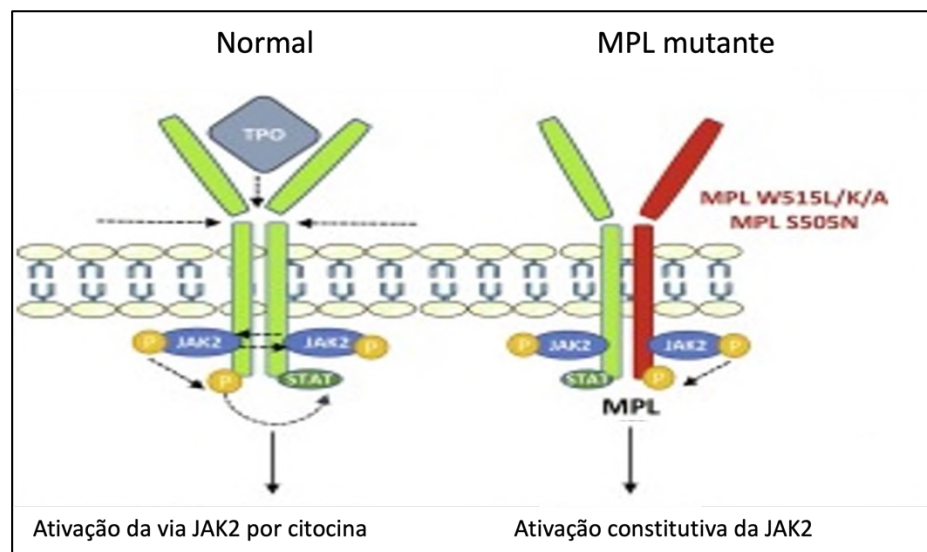
As mutações mais frequentes são a deleção de 52 pares de bases (c.1902\_1143del) ou mutação tipo 1 (CALRdel52) e a inserção de 5 pares de bases (c.1154\_1155insTTGTC) ou mutação tipo 2 (CALRins5). (227)

### 3.2.4 Mutações no gene *MPL*

O gene *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*) possui 12 exões, está localizado no cromossoma 1, na região 1p34 e codifica o recetor da trombopoietina, principal fator de crescimento dos megacariócitos. (224,226)

A maioria das mutações do gene *MPL* são encontradas no exão 10 e originam a substituição do aminoácido triptofano por outro aminoácido, no codão 515. (224,231)

A mutação resulta na ativação da via JAK2-STAT (figura 35), pois afeta um domínio da proteína cuja função é manter o recetor inativo na ausência de um ligante, resultando em proteínas constitutivamente ativas. (224)



**Figura 35 – Ativação da via JAK2-STAT pela proteína MPL mutante. [Adaptado de (231)]**

As mutações mais frequentes são as mutações p.W515L que representa a substituição de uma guanina por timina no nucleótido 1544, o que resulta na substituição do triptofano por uma leucina na proteína e a p.W515K que resulta na substituição do triptofano por uma lisina. (224)

### 3.2.5 Outras mutações nas NMP

Embora as mutações aqui já descritas sejam as consideradas de maior prevalência nas NMP, alguns casos de NMP não apresentavam nenhum dos principais marcadores moleculares (*JAK2 V617F*, *CALR* e *MPL*), e são classificadas como triplo negativos. Em contrapartida, foi descrita a presença de mutações em outros genes (tabela 3), como o *TET2*, o *ASXL1* e o *DNMT3A*, presentes em mais da metade dos casos de NMP. (207,233)

Foram ainda descritas mutações envolvidas na sinalização da via JAK-STAT (*CBL*, *SH2B3/LNK*), alterações em genes envolvidos na metilação do DNA (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1* e *IDH2*), na estrutura de cromatina (*EZH2*, *ASXL1*), na reparação do ADN (*TP53*) e mutações que afetam os genes reguladores de *splicing* (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*) como também se pode observar na tabela 3. (207,232,233)

**Tabela 3 - Mutações envolvidas nas NMP. [Retirado de (233)]**

Gene	Efeito da mutação	Policitemia Vera (%)	Trombocitemia Essencial(%)	Mielofibrose(%)
JAK2 (V617F)	Sinalização JAK/STAT	95-97	50-60	50-60
JAK2 (exão 12)	Sinalização JAK/STAT	1-2	0	0
CALR	Sinalização JAK/STAT?	0	25	30
MPL	Sinalização JAK/STAT	0	3-5	5-10
CBL	Sinalização JAK/STAT	Não encontrado	0-2	5-10
SH2B3/LNK	Sinalização JAK/STAT	2-20	2-6	3-6
ASXL1	Modificação epigenética	2	5-10	0-35
EZH2	Modificação epigenética	1-2	1-2	7-10
IDH1/2	Modificação epigenética	2	1	5
DNMT3a	Modificação epigenética	5-10	2-5	8-12
TET2	Modificação epigenética	10-20	4-5	10-20
SFR3B1	Splicing mRNA	2	2	4
SRSF2	Splicing mRNA	Não encontrado	Não encontrado	4-17
U2AF1	Splicing mRNA	<1	<1	1-8
ZRSR2	Splicing mRNA	<1	<1	<1
TP53	Reparação DNA	1-2	1-2	1-2

### 3.3 Classificação das NMP

As NMP foram definidas pela primeira vez pelo hematologista William Dameshek, em 1951, com o intuito de correlacionar as semelhanças clínicas entre a leucemia mieloide crónica, a policitemia vera, a trombocitemia essencial e a mielofibrose primária. (234)

Décadas depois, mais precisamente em 2001, e a fim de uniformizar a classificação das neoplasias hematopoiéticas, a WHO começou a publicar atualizações da classificação destas neoplasias, revendo-as periodicamente, de acordo com as informações científicas mais recentes.

Nesta primeira edição, as NMP eram denominadas de doenças mieloproliferativas crónicas. Faziam parte desse grupo a leucemia mieloide crónica, a policitemia vera, a trombocitemia essencial e a mielofibrose idiopática crónica. Também estavam incluídas nesse grupo doenças mieloproliferativas-*like*, que eram consideradas como doenças mieloproliferativas não-clássicas: a leucemia neutrofílica crónica, a leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílica, a mastocitose e a doença mieloproliferativa crónica inclassificável. A leucemia mielomonocítica juvenil pertencia ao grupo de doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas. O diagnóstico das doenças mieloproliferativas foi fundamentado em características clínicas e laboratoriais. Com exceção da leucemia mieloide crónica, que já possuía como confirmação a deteção do gene de fusão no cromossoma Philadelphia (Ph). (235,236)

Em 2008, a segunda revisão da WHO alterou o nome da classe de doenças mieloproliferativas para neoplasias mieloproliferativas. Faziam parte desse grupo a leucemia mieloide crónica BCR-ABL positiva, leucemia neutrofílica crónica, policitemia vera, mielofibrose primária, trombocitemia essencial, leucemia eosinofílica crónica sem outras especificações, mastocitose e neoplasias mieloproliferativas inclassificáveis. A leucemia mielomonocítica juvenil permaneceu no grupo de doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas, agora denominado de neoplasias mieloproliferativas/mielodisplásicas. O diagnóstico das NMP passou a considerar as anormalidades genéticas como critério importante para o diagnóstico. (236,237)

Em 2016, na terceira revisão da WHO, faziam parte das neoplasias mieloproliferativas: a leucemia mieloide crónica BCR-ABL positiva, a leucemia neutrofílica crónica, a policitemia vera, a mielofibrose primária, a mielofibrose primária (pré-fibrótico estágio inicial), a mielofibrose primária (estágio fibrótico evidente), a trombocitemia essencial, a leucemia eosinofílica crónica (não especificada de outra forma), neoplasias mieloproliferativas (inclassificável) e a mastocitose. A leucemia mielomonocítica juvenil permaneceu no grupo

das neoplasias mieloproliferativas/mielodisplásicas. O diagnóstico foi atualizado com a descoberta de novas mutações específicas em genes, como o *JAK2*, *CALR* e *MPL*. (238)

Em 2017, na quarta revisão da WHO, o grupo das neoplasias mieloproliferativas foi reduzido para: leucemia mieloide crônica, leucemia neutrofílica crônica, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária, leucemia eosinofílica crônica (sem outras especificações), neoplasias mieloproliferativas (inclassificável). A leucemia mielomonocítica juvenil permaneceu no grupo das neoplasias mieloproliferativas/mielodisplásicas e a mastocitose foi reclassificada para o seu próprio grupo. O diagnóstico baseou-se numa integração dos achados hematológicos, morfológicos, citogenéticos e genéticos moleculares. (209)

A revisão mais atual, a 5ª edição de 2022 (WHO-HAEM5), classificou como neoplasias mieloproliferativas: a leucemia mieloide crônica, a leucemia neutrofílica crônica, a policitemia vera, a trombocitemia essencial, a mielofibrose primária, a leucemia eosinofílica crônica e as neoplasias mieloproliferativas (sem outra especificação). A leucemia mielomonocítica juvenil passou a ser reconhecida como uma NMP da primeira infância. Os critérios de diagnóstico dessa edição serão descritos detalhadamente para cada NMP, por serem os critérios mais atuais utilizados no diagnóstico. (239)

### **3.4 Epidemiologia das NMP**

Os principais dados epidemiológicos das NMP são provenientes de estudos oncológicos na América do Norte e Europa. (240,241)

A coleção de dados nos Estados Unidos decorre do programa *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) que reúne dados desde 1973 pelo Instituto Nacional do Cancro do país e também pelo *Prevention's National Program of Cancer Registries* (NPCR) do Centro de Controlo de Doenças. De acordo com os dados coletados por esses programas, encontra-se uma incidência das desordens proliferativas de 2,1 a cada 100.000 indivíduos. A incidência é consideravelmente maior em homens (2,5 a cada 100.000) do que em mulheres (1,8 a cada 100.000). Também aponta para uma grande variação da incidência por estados, sendo o estado que apresenta maior incidência o Idaho (4,07 a cada 100.000) e o menor Delaware (0,81 a cada 100.000). (242)

Já um estudo pan-europeu estima a prevalência de 5,6 a cada 100.000 indivíduos e um estudo de 2008, na França, estima uma prevalência parecida, de 5,8 a cada 100.000. Um estudo conduzido na Indonésia, local com alguma confluência de etnias asiáticas, aponta para

uma incidência de 1 em 100.000 pessoas por ano. A incidência é maior em homens do que em mulheres e maior entre indivíduos de etnia Malaia do que em Chineses e Indianos. (240)

De acordo com o portal Orphanet, o portal multilíngue sobre doenças raras, os dados epidemiológicos das neoplasias mieloproliferativas são os que se podem observar na tabela 4.

**Tabela 4 - Dados epidemiológicos das NMP. [Adaptado de (243,244,245,246)]**

Leucemia mieloide crónica	A incidência anual é estimada entre 1 a 1,5 casos por 100.000 indivíduos e a sua prevalência é de cerca de 1 em 17.000 indivíduos.
Policitemia vera	A incidência anual é estimada em aproximadamente 1/36.000 a 1/100.000 indivíduos e a prevalência é estimada em 1/3.300 indivíduos. É mais comum em pessoas entre 50 e 70 anos.
Trombocitemia essencial	A prevalência é estimada em 1/4.200 indivíduos nos EUA e relatada em 1/3.333 indivíduos na Suécia.  A idade média de diagnóstico é de 60-65 anos, mas a doença pode ocorrer em qualquer idade, com outro pico de incidência em mulheres mais jovens.  A proporção entre mulheres e homens é de aproximadamente 2:1.
Mielofibrose primária	A incidência anual de Mielofibrose primária é de aproximadamente 1 caso por 100.000 indivíduos.

Apesar dos dados epidemiológicos serem por vezes escassos ou pouco precisos, visto que muitos casos passam sem deteção, a característica genética das neoplasias mieloproliferativas manifesta nos estudos epidemiológicos um grau de *clustering*, um aumento de incidência em determinadas populações por fatores geográficos e culturais. (247,248)

## 4 Neoplasias Mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativas

As NMP são divididas em *BCR::ABL1* positivas e *BCR::ABL1* negativas. É considerada *BCR::ABL1* positiva a leucemia mieloide crônica devido à presença do rearranjo *BCR::ABL1* que dá origem ao cromossoma Philadelphia. As demais NMP são consideradas NMP *BCR::ABL1* negativas, foco deste trabalho e que serão devidamente abordadas.

### 4.1 Policitemia Vera

A Policitemia Vera (PV) foi descrita pela primeira vez em 1892 e é a NMP *BCR::ABL1* negativa mais frequente. A PV é um distúrbio de célula estaminal hematopoiética clonal, gerado por mutações somáticas no gene *JAK2*, principalmente a *JAK2* p.V617F e mutações no exão 12. Conseqüentemente, observa-se uma pan-mielose (aumento da proliferação de eritrócitos, leucócitos e plaquetas), marcada pelo aumento do volume total da massa eritrocitária, independentemente dos mecanismos que regulam a eritropoiese. (249,250)

Os sintomas mais comuns são: fadiga, fraqueza, cefaleia, eritromelalgia, distúrbios visuais, dispneia, perda de peso, prurido, esplenomegalia, sangramento e trombose. (251)

A evolução clínica da PV possui três fases: a fase pré-policitémica, a fase de policitemia evidente e a fase pós-policitémica. A fase inicial, conhecida como pré-policitémica, é caracterizada por uma eritrocitose ligeira. Na fase de policitemia evidente, ocorre um aumento significativo da massa eritrocitária. E a fase pós-policitémica, é marcada pelo surgimento da fibrose medular, anemia e aumento acentuado do baço. (252,253)

O diagnóstico da PV segue os critérios definidos pela WHO e atualizados em 2022 (tabela 5).

**Tabela 5 - Critérios de diagnóstico da PV. [Adaptado de (207,254)]**

<b>Critérios principais ou maiores:</b>
1. Aumento da concentração da hemoglobina (Hb) e/ou hematócrito (Ht) Hemoglobina: >16,5 g/dL nos homens e >16 g/dL nas mulheres Hematócrito > 49% para homens e > 48% para mulheres
2. Biópsia da medula óssea evidenciando hiperplasia das três linhagens (pan-mielose) e megacariócitos pleomórficos e maduros.
3. Presença da mutação <i>JAK2</i> p.V617F ou mutações no exão 12 do gene <i>JAK2</i> .
<b>Critério secundário ou menor:</b>
1. Nível sérico subnormal de eritropoietina.

Para o diagnóstico da PV necessita-se da presença dos três critérios principais ou da presença de dois critérios principais e o critério secundário. (254)

## 4.2 Trombocitemia essencial

A trombocitemia essencial (TE) é uma doença proliferativa clonal caracterizada pela proliferação excessiva de megacariócitos na medula óssea e elevado número de plaquetas no sangue periférico. Foi descrita a primeira vez, em 1934, num caso com trombocitose sem eritrocitose marcada. É a segunda neoplasia mieloproliferativa *BCR::ABL* negativa mais frequente. E resulta de mutações somáticas envolvendo o recetor da trombopoietina, como a *JAK2 p.V617F*, e mutações nos genes *CALR* e *MPL*. (252,255)

Portadores de TE podem ser assintomáticos ou apresentam sintomas como: esplenomegalia, equimose, fenómenos trombóticos, fenómenos hemorrágicos, cefaleia, síncope, dor torácica atípica, distúrbios visuais e eritromelalgia. Podendo ainda apresentar complicações como acometimentos isquémicos transitórios, eritromelalgia e síndrome de Budd-Chiari. (256)

O diagnóstico da TE, segue os critérios definidos pela WHO e atualizados em 2022 (tabela 6).

**Tabela 6 - Critérios de diagnóstico da TE. [Adaptado de (207,254)]**

<b>Critérios principais ou maiores:</b>
1. Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$
2. Biópsia da medula óssea com proliferação e atipia de megacariócitos grandes, maduros e hiperlobulados. Raramente há reticulogênese grau 1.
3. Não atender aos critérios da WHO para LMC <i>BCR::ABL1</i> positiva, PV, MFP, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides
4. Presença de mutações, nos genes <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i>
<b>Critério secundário ou menor:</b>
1. Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência de trombocitose reativa

Para o diagnóstico da TE é necessária a presença dos quatro critérios principais ou a presença dos três primeiros critérios principais e o critério secundário. (254)

### 4.3 Mielofibrose primária

A mielofibrose primária (MFP) é uma neoplasia que afeta as células estaminais hematopoiéticas com alteração no estroma medular, o que acarreta a formação de fibrose. A fibrose é estimulada pela proliferação clonal que aumenta a quantidade de megacariócitos e a liberação de fator de crescimento fibrogénico. A proliferação está relacionada as mutações como a JAK2 p.V617F, mutações do gene *MPL* como a W515K e mutações do gene *CARL*. (207,216)

A MFP pode ser primária ou secundária. Quando secundária, pode ser secundária à PV ou à TE. O curso da doença pode ser dividido em duas fases: fase pré-fibrótica e fase fibrótica. A fase pré-fibrótica ou fase inicial, é marcada pela mieloproliferação crónica e hiperplasia megacariocítica atípica. A evolução do quadro até à substituição quase total do tecido hematopoiético por fibras reticulínicas, é chamada de fase fibrótica. (252,253)

Os principais sintomas na MFP são: fraqueza, cansaço, palpitação, dispneia, perda ponderal, esplenomegalia e hepatomegalia. (251)

O diagnóstico da MFP segue os critérios definidos pela WHO e atualizados em 2022 (tabela 7).

**Tabela 7 - Critérios de diagnóstico da MFP. [Adaptado de (207,254)]**

<b>Critérios principais ou maiores:</b>
1. Proliferação megacariocítica e atipia, sem fibrose reticulínica >grau 1, acompanhada de aumento da celularidade da medula óssea ajustada à idade, proliferação de granulócitos e, muitas vezes, diminuição da eritropoiese
2. Não atender aos critérios da WHO para <i>BCR::ABL1</i> positiva, a LMC, PV, ET, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides
3. Presença de mutações nos genes <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> ou, na ausência dessas mutações, presença de outro marcador clonal, ou não ter evidência para fibrose reticulínica reativa
<b>Critérios secundários ou menores:</b>
1. Presença de pelo menos uma das seguintes observações, confirmada em duas determinações consecutivas:
a. Anemia não atribuída a uma condição comórbida
b. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$
c. Esplenomegalia palpável
d. LDH aumentada acima do limite normal superior da faixa de referência institucional

Para o diagnóstico da PMV é necessária a presença de todos os três critérios principais e a presença de pelo menos um critério secundário. (254)

#### 4.4 Leucemia neutrofílica crônica

A Leucemia neutrofílica crônica (LNC) é uma NMP rara, descrita pela primeira vez em 1920. É caracterizada por hiperplasia da medula óssea, uma acentuada leucocitose neutrofílica com abundantes granulócitos em banda e segmentados no sangue periférico e hepatoesplenomegalia. (207)

As mutações mais comuns associadas à doença são as mutações do gene *CSF3R*, principalmente a T618I, uma mutação ativadora que codifica o recetor do fator estimulador de colônias de granulócitos. A fusão *BCR::ABL1* também pode estar presente em casos de LNC, porém diferencia-se da LMC por gerar uma proteína diferente, a p230. (257,258)

O diagnóstico da LNC segue os parâmetros definidos pela WHO e atualizados em 2022 (tabela 8).

**Tabela 8 - Critérios de diagnóstico da LNC. [Adaptado de (207,257)]**

1. Presença de uma mutação no gene <i>CSF3R</i>
2. Leucocitose $\geq 25 \times 10^9/L$
3. Neutrofilia (segmentados/banda) $\geq 80\%$
4. $< 10\%$ de células mieloides imaturas
5. $< 1\%$ de blastos circulantes
6. Ausência de desgranulopoiese ou monocitose ( $< 1 \times 10^9/L$ )

Os critérios de diagnóstico foram definidos para excluir a possibilidade de neutrofilia secundária e clonal associada a outras neoplasias mieloides. (257)

#### 4.5 Leucemia eosinofílica crônica

A leucemia eosinofílica crônica (LEC) é uma neoplasia mieloproliferativa rara, caracterizada pela proliferação clonal de eosinófilos morfológicamente anormais e precursores dos eosinófilos. Consequentemente, verifica-se uma hipereosinofilia persistente no sangue periférico e na medula óssea. (207)

O diagnóstico da LEC segue os parâmetros definidos pela WHO e atualizados em 2022 (tabela 9).

**Tabela 9 - Critérios de diagnóstico da LEC. [Adaptado de (207,257)]**

1. Hipereosinofilia sustentada por 4 semanas
2. Clonalidade e morfologia anormal da medula óssea
3. Eosinofilia $\geq 1,5 \times 10^9/L$
4. Presença de anormalidades citogenéticas: Trissomia 8, t(10;11)(p14;q21) e t(7;12)(q11;p11)

## 4.6 Leucemia mielomonocítica juvenil

A Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) é uma neoplasia mieloproliferativa derivada de células hematopoiéticas da primeira infância e o seu mecanismo patogênico envolve a ativação descontrolada da via RAS. As mutações mais encontradas são as mutações somáticas do gene *PTPN11*. (207)

O diagnóstico da LMMJ segue os parâmetros definidos pela WHO e atualizados em 2022. (tabela 10)

**Tabela 10 - Critérios de diagnóstico da LMMJ. [Adaptado de (207,254)]**

<b>Critérios principais ou maiores:</b>
1. Contagem de monócitos $\geq 1 \times 10^9/L$
2. Percentagem de blastos no sangue periférico e medula óssea $< 20\%$
3. Esplenomegalia
4. Ausência do cromossoma Philadelphia (ausência do rearranjo <i>BCR::ABL1</i> )
<b>Critérios secundários ou menores:</b>
1. Mutação somática nos genes <i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> ou <i>NRAS</i>
2. Diagnóstico clínico de mutação no gene <i>NF1</i>
3. Mutação no gene <i>CBL</i> da linha germinativa e perda de heterozigotia de <i>CBL</i>

Para o diagnóstico da LMMJ é necessária a presença de todos os quatros critérios principais e a presença de pelo menos um critério secundário. (254)

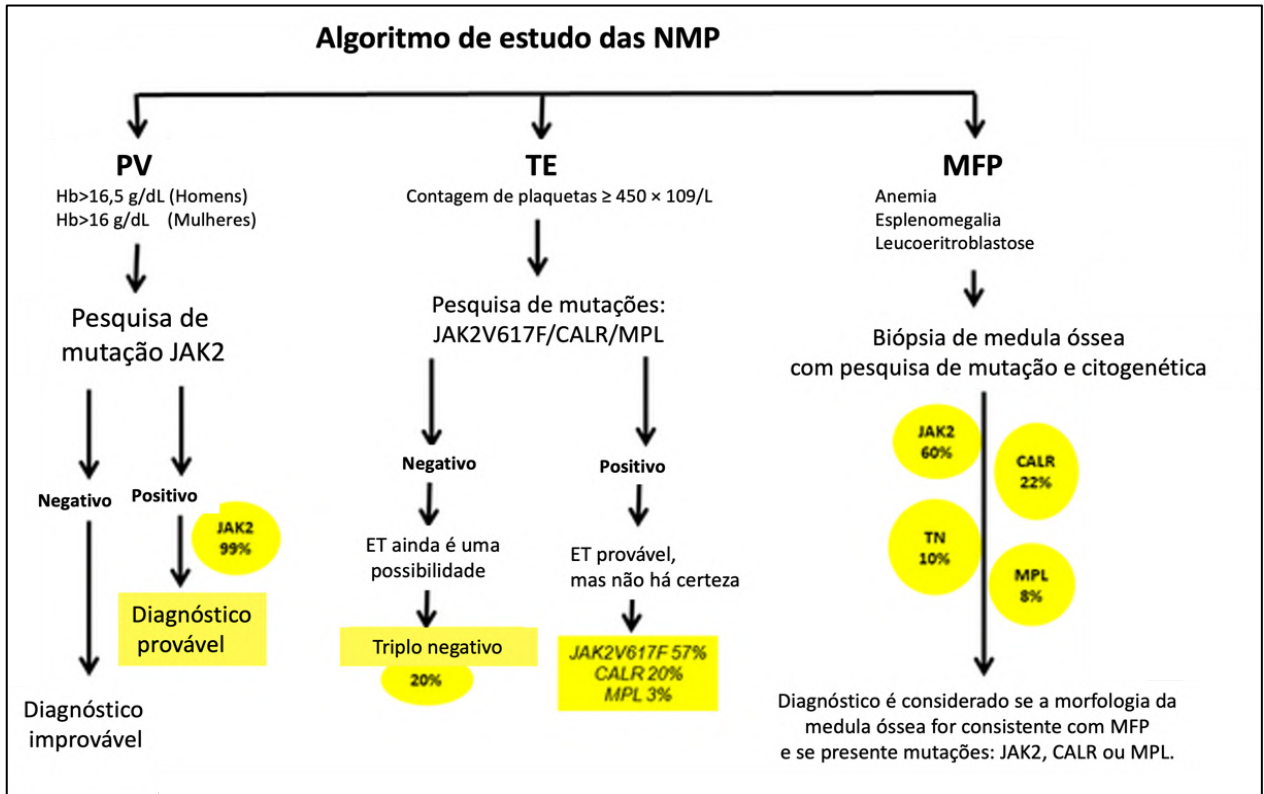
## 4.7 Neoplasias mieloproliferativas sem outras especificações

A categoria neoplasias mieloproliferativas sem outras especificações inclui neoplasias semelhante às NMP mas que não atendem os requisitos para serem classificadas nas categorias acima citadas de NMP. (207)

É exemplo de uma neoplasia mieloproliferativa sem outras especificações a síndrome mieloproliferativa 8p12, causada pela fusão do gene *FGFR1* com genes associados. Caracteriza-se por ser *BCR::ABL1* negativa e apresenta um transtorno mieloproliferativo, com a presença de eosinofilia e um linfoma. (255,259)

## 5 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico das neoplasias hematológicas é importante por influenciar diretamente o tratamento e prognóstico de cada caso. O diagnóstico laboratorial das NMP (figura 36) baseia-se principalmente nas biópsias e aspirados de medula óssea, citogenética e marcadores moleculares. (260)



**Figura 36 - Algoritmo de diagnóstico das NMP *BCR::ABL1* negativas. PV- Policitemia Vera; TE- Trombocitemia essencial; MFP- Mielofibrose primária [Adaptado de (260)].**

O diagnóstico laboratorial das NMP pode ser subdividido em diagnóstico hematológico e diagnóstico molecular. Cada análise realizada, tanto no âmbito hematológico, quanto no molecular será seguidamente aprofundada.

## 5.1 Diagnóstico hematológico

O diagnóstico hematológico fornece ao médico informações importantes sobre as condições hematológicas do utente. Consiste inicialmente num exame de rotina, como o hemograma e, em caso de suspeita de NMP, torna-se necessária a execução de exames mais completos. (208)

### 5.1.1 Hemograma

O hemograma é o exame quantitativo e morfológico do sangue periférico. Através do hemograma é possível obter a concentração de hemoglobina, o hematócrito e os índices eritrocitários. Também é possível obter a avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. (208)

A amostra utilizada, o sangue periférico, é analisada em equipamento automatizado. Os eritrócitos e plaquetas são comumente analisados por impedância elétrica com focagem hidrodinâmica. Os leucócitos são analisados através de citometria de fluxo fluorescente. O doseamento da hemoglobina é realizado através do método de sulfato lauril de sódio (SLS) livre de cianeto. (260)

No hemograma, nos casos de PV, é comum registarem-se valores aumentados de hemoglobina acima de 16,5 g/dL e hematócrito acima de 49% em homens; e hemoglobina acima de 16,0 g/dL e hematócrito acima de 48% em mulheres. É observado, também, um aumento do número de eritrócitos e leucócitos. A leucocitose verifica-se com basofilia, eosinofilia, monocitose e com desvio até mielócitos. (251,256)

Na tabela 11, que apresenta o hemograma de um caso, do sexo masculino, com PV, é possível observar o aumento dos valores de hemoglobina e hematócrito. (261)

**Tabela 11- Valores do hemograma de um caso de PV. [Retirado de (261)]**

Hemoglobina [g/dL]	21,3
Eritrócitos [ $\times 10^6$ ]	8,97
Hematócrito [%]	66,3
VCM [fL]	73,9
HCM [pg]	23,7
CHCM [%]	32,1
RDW-CV [%]	23,3
Leucócitos [ $\times 10^3$ /mL]	9,6
Segmentados [%]	71,2
Eosinófilos [%]	7,8%
Basófilos [%]	1,1%
Linfócitos [%]	14,7
Monócitos [%]	5,2
Plaquetas [ $\times 10^3$ /mL]	421
MPV [fL]	10,8

Já no caso de TE, a principal alteração no hemograma é a trombocitose, com contagem de plaquetas  $\geq 450 \times 10^9/L$ . Na tabela 12 é possível observar um exemplo de trombocitose num caso confirmado de TE, de um doente, do sexo masculino. (251,262)

**Tabela 12- Valores do hemograma de um caso de TE. [Adaptado de (262)]**

Hemoglobina (g/dL)	13,7
Hematócrito (%)	44,6
Volume Corp. Médio (fl)	70,8
Hemoglobina Corp. Média (pg)	21,7
Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	16,6
Bastonetes (%)	01
Segmentados (%)	73
Eosinófilos (%)	09
Basófilos (%)	00
Linfócitos (%)	15
Monócitos (%)	02
Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	1630

Na MFP, o hemograma é marcado por anemia, com Hb inferior a 10g/dL, normocrômica e normocítica. Em poucos casos apresenta anemia hipocrômica e microcítica por deficiência de ferro associada. Na observação da morfologia dos eritrócitos, observa-se poiquilocitose, principalmente com dacriócitos; observa-se, ainda, leucoeritroblastose, presença de células jovens granulocíticas e eritrocíticas. Na fase pré-fibrótica da doença, o hemograma pode apresentar aumento da contagem de plaquetas e leucócitos. Já na fase fibrótica é possível observar um hemograma com leucopenia e trombocitopenia. Na fase acelerada da MFP, há a presença de 10% a 19% de blastos no sangue periférico. (251,252,256)

Na tabela 13, que apresenta o hemograma de um doente, do sexo masculino, com MFP, é possível observar a anemia, a presença de dacriócitos e a leucoeritroblastose. (263)

**Tabela 13-Valores do hemograma de um caso de MFP. [Adaptado de (263)]**

Achados laboratoriais
Hb: 9,10 g/dL Leucócitos: 3.100 /mm <sup>3</sup> Plaquetas: 160.000/mm <sup>3</sup>
Achados morfológicos
Eritroblastos : 2%, Mielócitos ; 6%, Metamielócios: 4% Presença de dacriócitos

Na LNC, o hemograma apresenta leucocitose com predomínio de neutrófilos segmentados e bastões. Com a presença, ainda, de granulócitos imaturos e mieloblastos. (256)

Na tabela 14, no hemograma de um doente, do sexo masculino, com LNC, é possível observar a leucocitose com predomínio de neutrófilos. (264)

**Tabela 14-Valores do hemograma de um caso de LNC. [Adaptado de (264)]**

Hemoglobina (g/dl)	6,35
Hematocrito (%)	19,6
Leucocitos (/ml)	48.400
Plaquetas (/ml)	12.400
<b>Contagem diferencial:</b>	
Blastos	3%
Promielocitos	6%
Metamielocitos	2%
Bastonetes	6%
Neutrófilos maduros	71%
Mielocitos e maduros	64.6%
Monocitos	10%
Linfocitos	2%
Plasmocitos	
Eritroblatos (/100 leucocitos)	1

Na LEC, o hemograma apresenta eosinofilia  $\geq 1,5 \times 10^9/L$ . Morfologicamente, os eosinófilos apresentam granulação e áreas claras no citoplasma, vacuolização citoplasmática, hiper ou hiposegmentação nuclear e tamanho aumentado. (256)

Na tabela 15, no hemograma de um doente, do sexo masculino, com LEC, é possível observar a leucocitose com aumento dos números de eosinófilos. (265)

**Tabela 15 - Hemograma de um caso de LEC. [Adaptado de (265)]**

Hemoglobina (g/dL)	10
Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	18,2
Eosinófilos (%)	9,1
Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	177

Na LMMJ, o hemograma apresenta monocitose  $\geq 1 \times 10^9/L$  e  $< 20\%$  de blastos no sangue periférico. (256)

Na tabela 16, no hemograma de um doente, do sexo masculino, com LMMJ, é possível observar a leucocitose com aumento dos números de monócitos. (266)

**Tabela 16 - Hemograma de um caso de LMMJ. [Adaptado de (266)]**

<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>5,6</b>
<b>Hematócrito</b>	<b>21,0</b>
<b>Leucócitos (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	<b>48,6</b>
<b>Segmentados (%)</b>	<b>45</b>
<b>Eosinófilos (%)</b>	<b>1</b>
<b>Basófilos (%)</b>	<b>3</b>
<b>Linfócitos (%)</b>	<b>27</b>
<b>Monócitos (%)</b>	<b>15</b>
<b>Metamielócitos (%)</b>	<b>6</b>
<b>Blastos (%)</b>	<b>3</b>
<b>Eritroblastos</b>	<b>138</b>
<b>Plaquetas (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	<b>60</b>

A presença de blastos no sangue periférico de uma NMP, num valor superior a 20%, indica a progressão da doença: uma transformação leucémica para uma leucemia mieloide aguda (LMA). (251)

### **5.1.2 Mielograma**

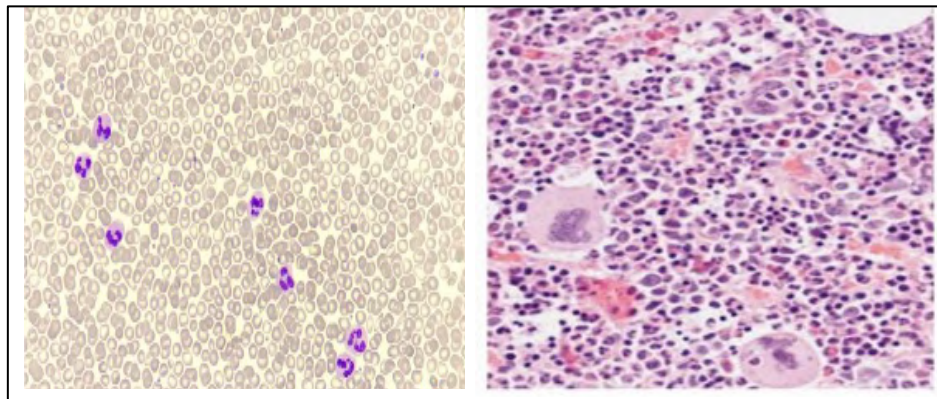
A distinção entre os tipos de NMP é feita através dos achados morfológicos do sangue periférico, associados a outros parâmetros, como a avaliação morfológica da medula óssea. A análise da medula óssea pode ser feita por meio de esfregaço proveniente de punção medular (mielograma), ou pela biópsia da medula óssea. (207,208)

O mielograma é um exame realizado tanto para o diagnóstico, como para prognóstico, pois a infiltração medular mede o grau evolutivo da doença. A biópsia de medula óssea é um

exame anatomopatológico realizado em neoplasias, com a finalidade de estudar o grau de infiltração e as condições do estroma medular. (208)

O mielograma é realizado através da aspiração da medula óssea, a colheita é realizada principalmente no osso íliaco, esterno e tibia. O material é colhido em tubo com anticoagulante EDTA e são realizados esfregaços sanguíneos em lâminas. (208)

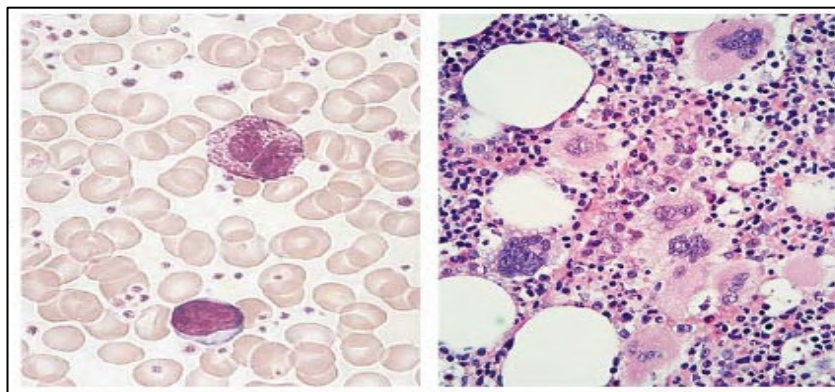
No caso da PV, a biópsia da medula óssea apresenta uma pan-mielose, com hiperplasia das linhagens eritrocítica, granulocítica e megacariocítica (figura 37); e megacariócitos pleomórficos. Pode haver um aumento discreto de fibras reticulínicas. (251,256)



**Figura 37 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de PV. [Adaptado de (267,268)]**

No caso de TE, a medula óssea apresenta proliferação e atipia de megacariócitos grandes, maduros e hiperlobulados. Raramente há reticulogênese grau 1. (251)

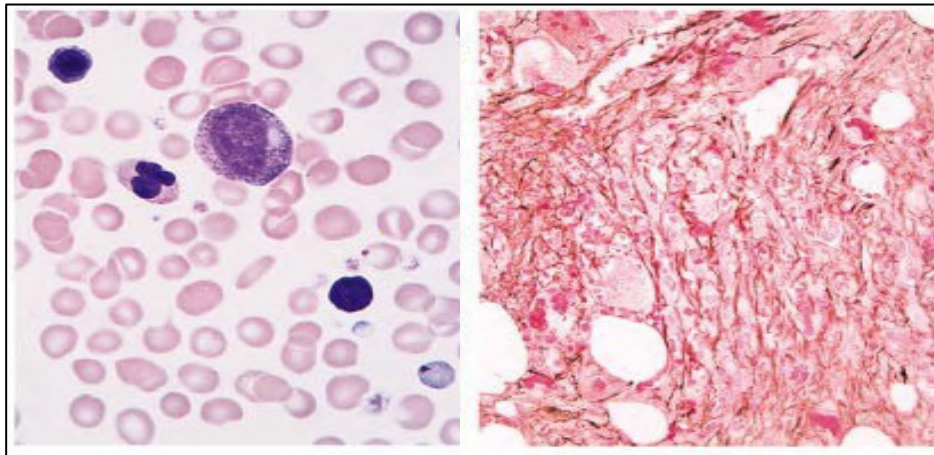
Na figura 38, é possível observar a trombocitose em sangue periférico (imagem da esquerda) e, na medula óssea (imagem da direita), é possível observar uma proliferação dos megacariócitos. (268)



**Figura 38 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de TE. [Adaptado de (268)]**

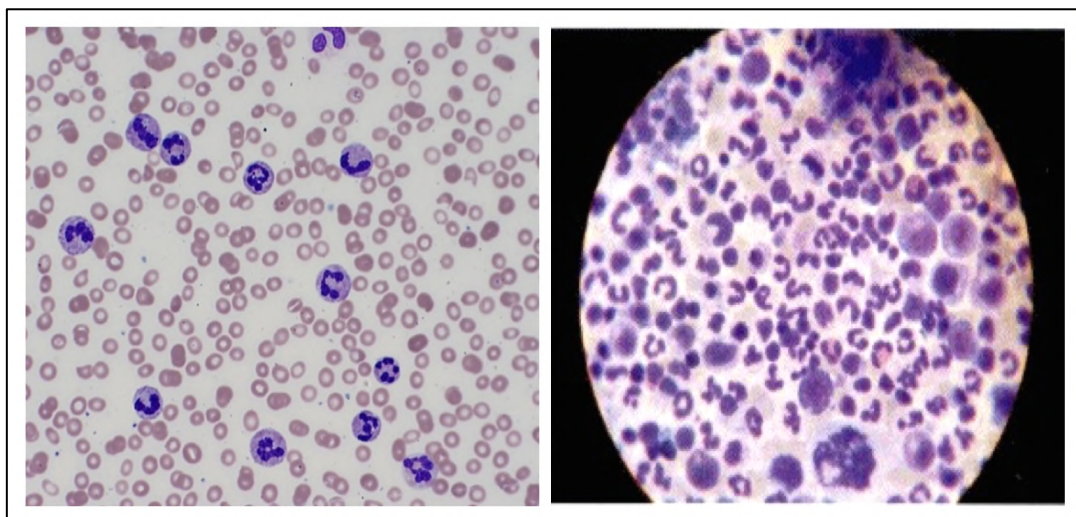
Na MFP, a punção para realizar o mielograma pode ser difícil devido a fibrose medular. Além da fibrose, a medula óssea apresenta proliferação de megacariócitos com atipias: clusters, núcleos hipercrômicos e irregulares e fibrose. (208,251)

Na figura 39, é possível ver à esquerda, em sangue periférico, a poiquilocitose e à direita, na medula óssea, a fibrose medular. (268)



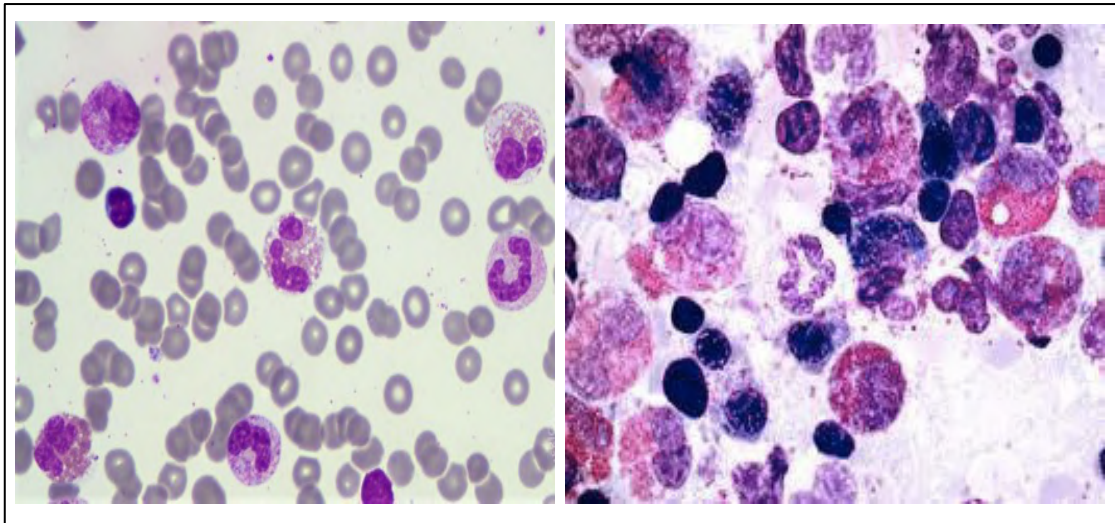
**Figura 39 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de MFP. [Adaptado de (268)]**

Na LNC, a medula óssea apresenta hiper celularidade, com aumento de granulócitos (figura 40) e blastos de padrão de maturação normal e raramente se observa fibrose discreta. (256)



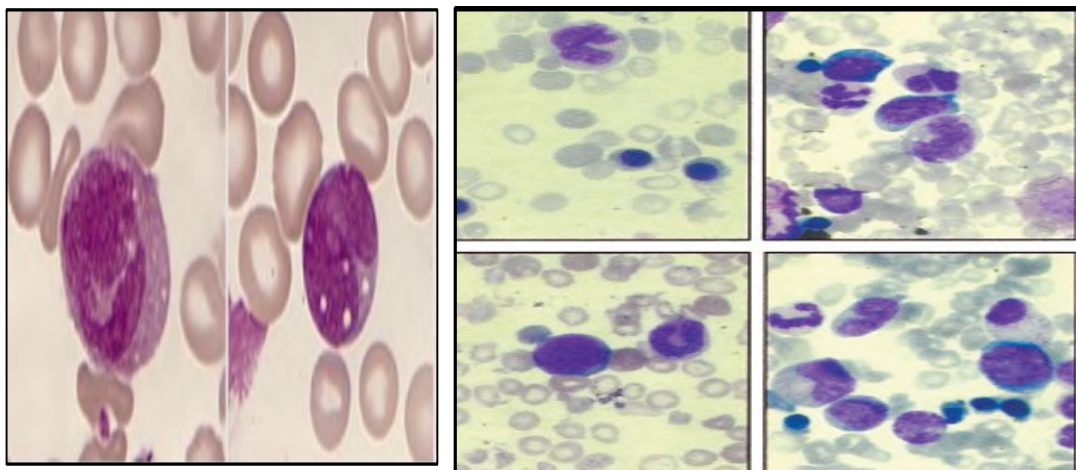
**Figura 40 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de LNC. [Adaptado de (269,270)]**

Na LEC a medula é hipercelular devido a proliferação eosinofílica (figura 41). A eritropoiese e megacariocitopoiese são normais e, em alguns casos, há fibrose. (256)



**Figura 41- Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de LNE. [Adaptado de (271,272)]**

Na LMMJ, a medula pode apresentar uma contagem < 20% de blastos. Na figura 42 pode observar-se a medula de um doente com LMMJ, apresentando hipercelularidade, monocitose, moderado aumento de blastos e hiperplasia granulocítica e eritróide. (256,266)



**Figura 42 - Achados no sangue periférico (esquerda) e na medula óssea (direita) num caso de LMMJ. [Adaptado de (266,273)]**

## 5.2 Diagnóstico molecular

As novas ferramentas de diagnóstico molecular permitiram aprimorar o diagnóstico das NMP. O foco tem sido a identificação das alterações genéticas em amostras de sangue periférico, tecidos ou fluidos corporais. (207,274,275)

As diversas técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para a detecção das mutações presentes nas NMP: no caso da PV, principalmente a presença da mutação JAK2 V617F ou de mutações no exão 12 do gene *JAK2*; no caso de TE, a presença de mutações nos genes *JAK2*, *CALR* ou *MPL*, na MFP, a presença da mutação JAK2V617F ou de mutações nos genes *CALR* e *MPL*. (251,256)

A mutação JAK2 V617F, é a mutação mais frequente nas NMP *BCR::ABL1* negativas. Diversas técnicas (tabela 17) podem ser utilizadas para a sua detecção.

**Tabela 17- Métodos de detecção da mutação JAK2 V617F. [Retirado de (256)]**

Método	Sensibilidade (%)	Vantagens	Desvantagens
Sequenciamento Sanger	20	Deteção simultânea de outras mutações.	Baixa sensibilidade; técnica demorada; não quantitativo.
PCR-RT	0.01-5	Alta sensibilidade; alto rendimento; rápido	Detecta apenas mutações alvo. Requer um ciclador em tempo real
PCR (AS)	0.1-1	Alta sensibilidade; simples de executar	Detecta apenas mutações alvo; não é quantitativo; processamento pós-PCR ou é necessário um ciclador
qPCR (AS, LNA)	0.1-0.01	Alta sensibilidade; quantitativo	Detecta apenas mutações alvo
dHPLC	1-2.5	Alto rendimento; rápido	Requer manipulação pós-PCR; tecnicamente desafiador.
HRM	5-10	Simple de executar; semiquantitativo; baixo custo	Sensibilidade moderada a baixa; pouca reprodutibilidade em pequenas amostras.
Pirosequenciamento	5-10	Deteção simultânea de outras mutações; simples de executar; quantitativo; baixo custo	Detecta apenas mutações alvo; sensibilidade relativamente baixa; requer equipamento próprio
RFLP	1-10	Sem equipamento especial; baixo custo	Sensibilidade relativamente baixa; requer manipulação pós-PCR; risco de falso-positivos e falso-negativos; não quantitativo; trabalho intensivo

O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) alelo específico (ASO-PCR) é a técnica mais utilizada para a detecção de JAK2 V617F, por ser uma técnica de fácil execução e de alta sensibilidade. Como técnica de confirmação de resultados, nos casos com amplificação de baixa intensidade, é utilizado o PCR em tempo real (PCR-RT). (256,276,277,278)

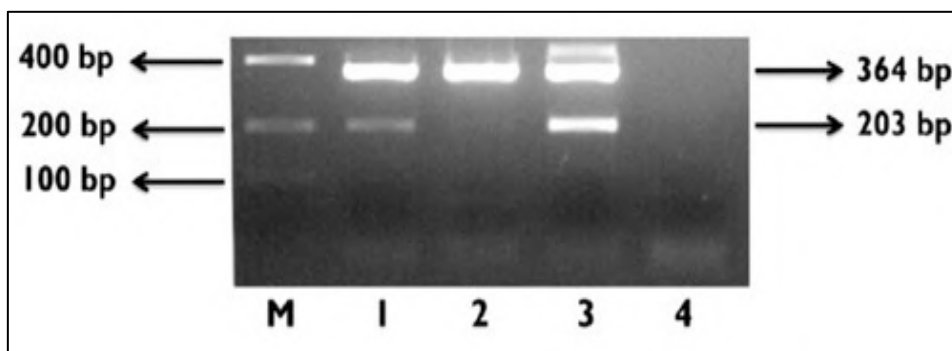
Nas amostras com ausência da mutação JAK2 V617F, é realizada a pesquisa de outras mutações frequentes nas *BCR::ABL1* negativas, como as mutações nos genes *JAK2* (Exão 12), *CALR* (Exão 9) e *MPL* (Exão 10), através de sequenciação de Sanger. Nos casos de suspeita de mutações de baixa frequência alélica é realizado, posteriormente, sequenciação por NGS (*Next Generation Sequencing*). Mutações adicionais, que apresentam uma menor prevalência nas NMP, também são pesquisadas através de NGS. (278)

### 5.2.1 PCR alelo específico (ASO-PCR)

O ASO-PCR é uma técnica tradicionalmente usada em laboratórios de diagnóstico molecular para a detecção da mutação JAK2 V617F. A técnica possui as vantagens de ser uma técnica rápida, relativamente simples e com alta sensibilidade. Entretanto, tem como desvantagem ser uma técnica que deteta apenas a mutação alvo. (277,279)

A reação em cadeia da polimerase usando oligonucleotídeos específicos para alelos é um método para a detecção de mutações em que apenas o oligonucleotídeo perfeitamente combinado é capaz de atuar como um *primer* para amplificação. O protocolo do ASO-PCR para detecção da mutação JAK2 V617F amplifica um produto de 364 pb, alelos mutantes e selvagens e serve como um controlo interno; e um produto de 203 pb, quando o utente possui a mutação JAK2 V617F. (279)

Na figura 43 é possível visualizar o resultado de um gel de agarose, de uma reação de ASO-PCR para detecção da mutação JAK2 V617F. Como se pode observar, na faixa 1, se encontra o resultado positivo para a pesquisa da mutação JAK2 V617F, num caso de PV. Na faixa 2, é possível visualizar o resultado negativo para a pesquisa da mutação JAK2 V617F realizada num utente com gamapatia monoclonal. Na faixa 3, se encontra um controlo positivo para a pesquisa da mutação JAK2 V617F. Na faixa 4, se encontra o controlo negativo do PCR. (280)



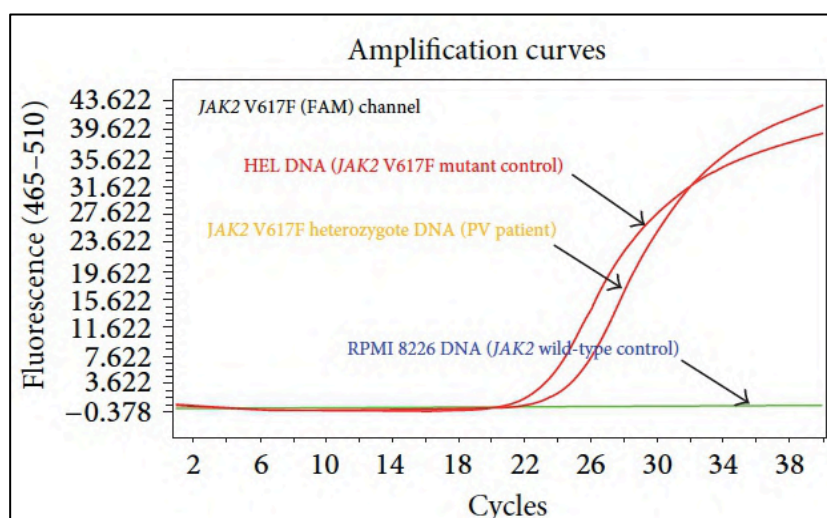
**Figura 43 – Mutação JAK2 V617F detetada por ASO-PCR num caso de PV.** [Adaptado de (280)] M-marcador de pesos moleculares; 1 - resultado positivo para a mutação JAK2 V617F; 2 - resultado negativo; 3 - controlo positivo para a mutação JAK2 V617F; 4 - controlo negativo do PCR

### 5.2.2 PCR em tempo real (qPCR)

Nos casos em que ocorre uma amplificação de baixa intensidade na região da banda do alelo mutado, através da reação do ASO-PCR, faz-se a necessária confirmação do resultado por PCR em tempo real. (277)

O PCR em tempo real é uma variação do PCR convencional, em que é possível visualizar em tempo real a reação de PCR, no momento em que decorre. Isto é possível devido à presença, na mistura de PCR, de substâncias que se intercalam no DNA em cadeia dupla, emitindo fluorescência, ou através de sondas específicas complementares à cadeia de DNA que se quer analisar, com fluorocromos ligados às extremidades. (281)

A figura 44 exemplifica um ensaio qPCR da sonda TaqMan para a mutação JAK2 V617F. (282)



**Figura 44 - Detecção da mutação JAK2 V617F por qPCR.** [Retirado de (282)]

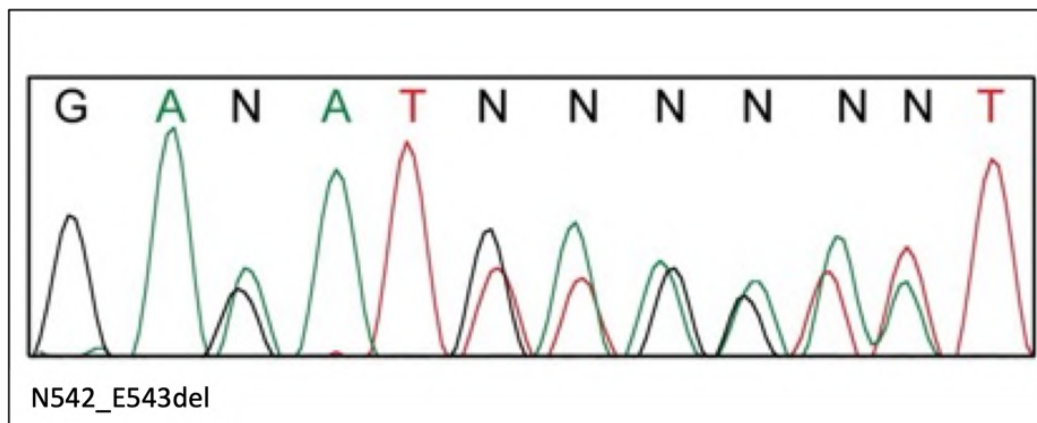
### 5.2.3 Sequenciação de Sanger

Nas amostras com ausência da mutação JAK2 V617F, é realizada a pesquisa de outras mutações mais frequentes nas *BCR::ABL1* negativas, como as mutações dos genes *JAK2* (Exão 12), *CALR* (Exão 9) e *MPL* (Exão 10), através de sequenciação de Sanger. (277)

A técnica de sequenciação de Sanger é utilizada para determinar a sequência de bases (adenina, guanina, citosina, timina) de um determinado fragmento de DNA e, com essa informação, caracterizar alelos associados a doenças ou detectar mutações/variantes relevantes para o diagnóstico de doenças genéticas. (283)

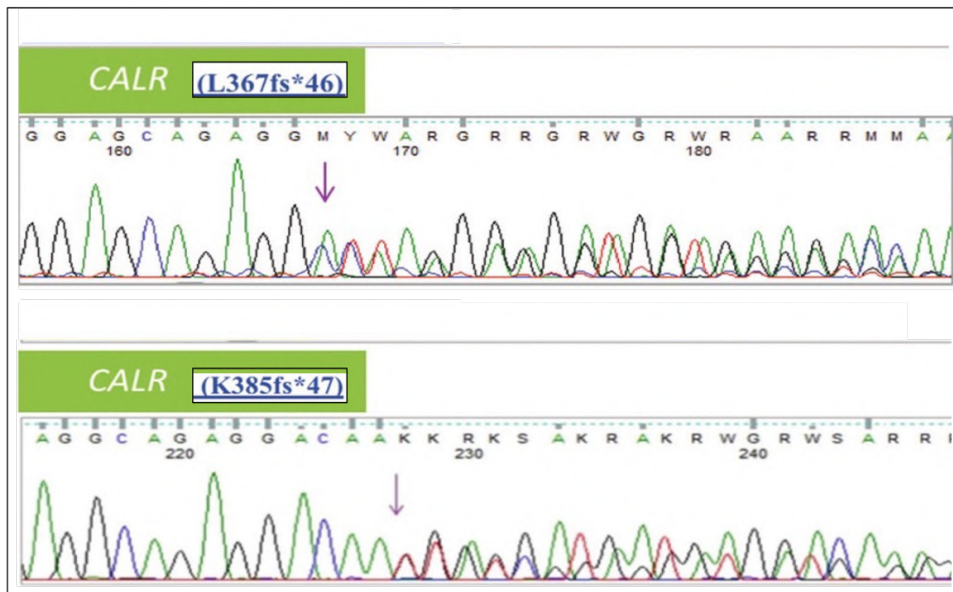
Na reação de sequenciação é utilizado um dos *primers*, o que resulta na amplificação de apenas uma das cadeias. A reação contém, em baixa concentração, didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP), cuja incorporação vai terminar a extensão da cadeia. Esses nucleótidos estão marcados com quatro fluorocromos diferentes e a sua incorporação origina fragmentos de tamanhos diferentes, onde o último nucleótido é identificado pela cor. A caracterização da sequência é obtida pela separação eletroforética dos fragmentos e respectiva detecção das fluorescências. (283)

A figura 45 apresenta um eletroferograma de sequenciação de Sanger para a mutação JAK2, demonstrando a presença da mutação p.N542\_E543del. (284)



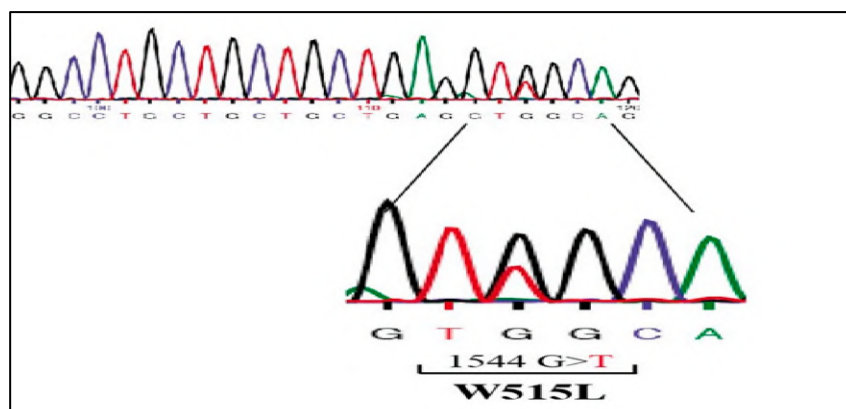
**Figura 45 - Detecção da mutação JAK2 por sequenciação de Sanger. [Adaptado de (284)]**

A figura 46 apresenta uma sequenciação de Sanger para mutações no gene *CALR* (Exão 9), que permite evidenciar a mutação *CALR* tipo 1 (L367fs\*46) e a mutação *CALR* tipo 2 (K385fs\*47). (285)



**Figura 46 - Detecção de mutações no gene *CALR* por sequenciação de Sanger. [Adaptado de (285)]**

A figura 47 apresenta uma sequenciação de Sanger para detetar mutações no gene *MPL* (Exão 10), demonstrando a presença da mutação W515L (c.1544G>T), onde se verifica a substituição de uma guanina por timina no nucleosídeo 1544. (286)



**Figura 47 - Detecção da mutação W515L no gene *MPL* por sequenciação de Sanger. [Adaptado de (286)]**

#### 5.2.4 NGS (*Next Generation Sequencing*)

Para as mutações de baixa frequência alélica, que não são detetadas por sequenciação de Sanger, e mutações adicionais, como as mutações nos genes *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1* e *TP53*, são efetuadas análises por NGS. (277)

O NGS é capaz de analisar múltiplas regiões genéticas com um limite sensível de detecção e alta precisão. Enquanto a sequenciação de Sanger apresenta um limite de detecção em torno de 20%, o NGS é capaz de detetar alelos mutantes com uma frequência inferior a 1%. (286,287)

Para a realização do NGS, é feita a preparação de bibliotecas NGS. Para isso, é feita a diluição dos produtos de PCR até à concentração inicial recomendada. Após isso, é feita a Tagmentação (processo de fragmentação e inserção de adaptadores) e uma nova amplificação por PCR para inserção de indexes que permitem a identificação única de cada amostra. Uma vez preparadas, as bibliotecas são normalizadas, fazendo uma *pool* que é desnaturada e diluída para ser submetida ao processo de geração de clusters. Este processo ocorre após hibridação dos adaptadores com os *primers* que se encontram na superfície da *flow cell*. O DNA da biblioteca é sequenciado através de um instrumento de sequenciação e os dados são posteriormente analisados. (288)

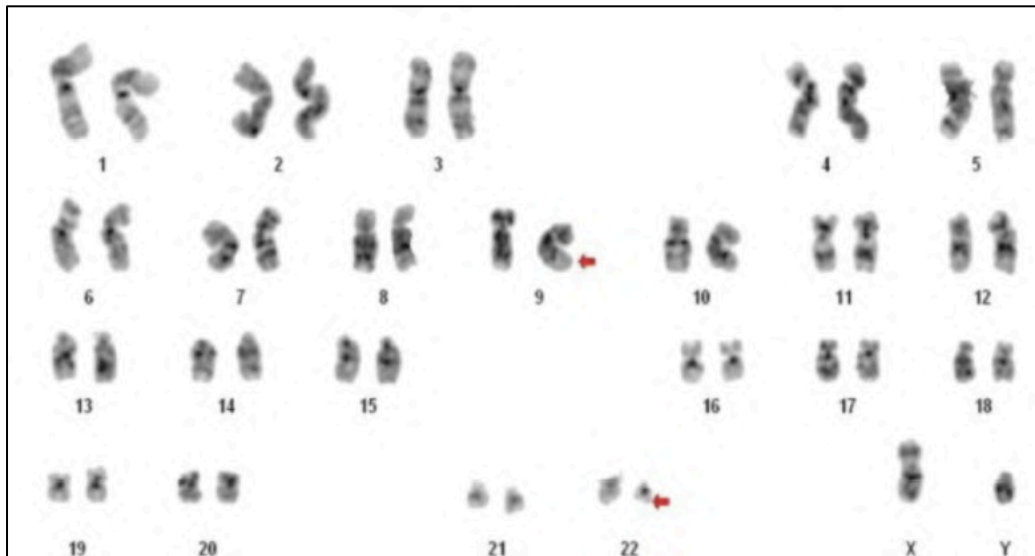
A tabela 18, exemplifica a detecção de várias mutações, num caso de TE, por NGS utilizando o painel *Ion Ampliseq Cancer Hotspot*, capaz de detetar 2.800 mutações COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) de 50 oncogenes e genes supressores de tumores. (286)

**Tabela 18- Mutações detetadas por NGS num caso de TE. [Retirado de (286)]**

Gene	Coding	Protein	Cosmic ID	Type of Mutation
DNA from peripheral blood				
<i>MPL</i>	c.1502T>C	p.V501A	COSM86964	Substitution-Missense
<i>MPL</i>	c.1543T>A	p.W515R	COSM29008	Substitution-Missense
DNA from bone marrow				
<i>MPL</i>	c.1502T>C	p.V501A	COSM86964	Substitution-Missense
<i>MPL</i>	c.1543T>A	p.W515R	COSM29008	Substitution-Missense
<i>JAK2</i>	c.1849G>T	p.V617F	COSM12600	Substitution-Missense
<i>PTEN</i>	c.51A>C	p.Q17H	Novel	Substitution –Missense
<i>TP53</i>	c.532delC	p. H178Tfs*69	COSM43978	Deletion Frameshift
<i>PIK3CA</i>	c.3130A>G	p.N1044D	COSM27134	Substitution-Missense
<i>KIT</i>	c.1697A>C	p.N566T	COSM9233350	Substitution-Missense

### 5.2.5 Cariótipo de bandas G

O início do diagnóstico citogenético das NMP é a cariotipagem. A pesquisa do cromossoma Philadelphia (figura 48), tão importante no diagnóstico da LMC, é essencial, pois a confirmação da sua ausência faz parte do diagnóstico diferencial das NMP *BCR::ABL1* negativas.



**Figura 48 - Cariótipo com a presença do cromossoma Philadelphia -  $t(9;22)(q34;q11)$ . Os cromossomas 9 e 22 estão assinalados com setas vermelhas. [Retirado de (274)]**

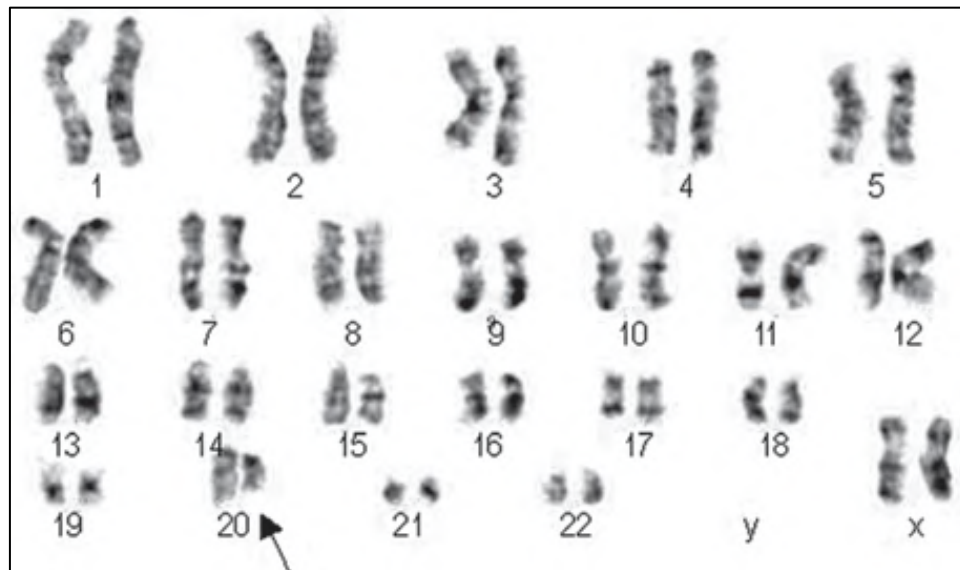
Através do estudo do cariótipo é possível obter informações acerca do número de cromossomas por célula, da composição dos cromossomas sexuais e também identificar anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais, sejam elas constitucionais ou adquiridas.

O cariótipo é realizado através da cultura de linfócitos. Os cromossomas tornam-se visíveis nas células durante a mitose, especialmente na metáfase, quando atingem seu máximo de condensação. Nessa fase, o centrómero e os dois cromátídeos de cada cromossoma são perfeitamente visíveis a microscópio ótico. (193,195)

Na PV, as alterações cromossômicas mais comumente observadas são: +8, +9, del(20q), ganho de material no 1q, del(1q) e del(13q). Com a progressão da doença, as anormalidades citogenéticas chegam a atingir em torno de 80% quando a PV evolui para a fase fibrótica, e chegam a 100% quando o quadro evolui para uma leucemia aguda. (256)

Na TE, não há alterações citogenéticas específicas. O índice de alteração é de 5% e as alterações mais frequentes são a trissomia do 8 e 9 e as deleções 13q e 20q. (256)

Na MFP, os cariótipos apresentam-se alterados em 60% dos casos, com del(13q), del(20q) (figura 49), trissomia parcial 1q, +8 e +9. Entretanto, existem casos em que não se é possível realizar o cariótipo devido à fibrose medular. (256,289)



**Figura 49 - Cariótipo 46,XX,del(20),(q13.1). A seta assinala a deleção. [Retirado de (289)]**

Na LNC, o cariótipo encontra-se normal na maioria dos casos. As raras alterações presentes são comuns a outras NMP, como +8, +9, del(20q) e del(11q). (256)

Na LEC, a análise do cariótipo é uma análise de exclusão, pois quando está presente o gene de fusão t(5;12), o diagnóstico é direcionado para leucemia mielomonocítica crônica com eosinofilia. (256)

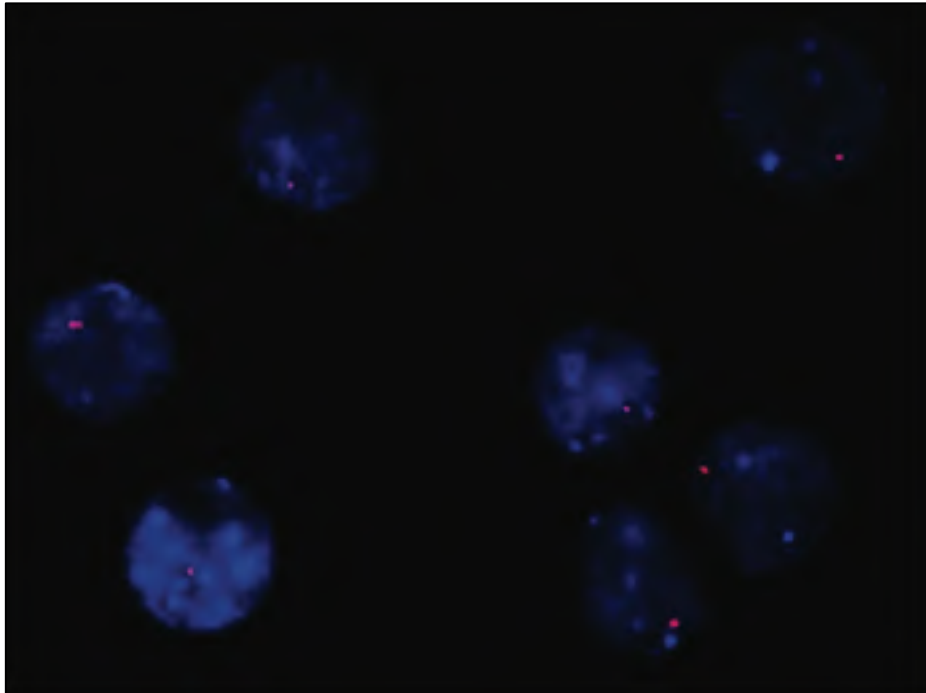
Na LMMJ, o cariótipo é uma análise de exclusão, pois a presença do cromossoma Ph direciona para o diagnóstico da LMC. (256)

### **5.2.6 FISH**

O FISH é uma técnica molecular utilizada para analisar cromossomas, especialmente para a deteção de rearranjos associados a doenças hematológicas, microdeleções/microduplicações, anomalias estruturais e rearranjos subteloméricos. (200)

A técnica FISH é um método que analisa uma região cromossômica específica através de fragmentos de DNA marcados com fluorocromos - sondas - que hibridizam com a amostra de DNA numa lâmina. (200)

Na figura 50 é possível identificar a del(20q) por FISH, presente em casos de PV, TE e MFP.



**Figura 50 – Identificação da deleção 20q (cor vermelha) por FISH. [Adaptado de (290)].**

O FISH é utilizado para detetar as mesmas alterações, já descritas anteriormente, de cada classe das NMP. É uma técnica vantajosa por poder ser realizada em situações nas quais ainda não se tem metáfases para análise de cariótipo e por poder ser feito através de amostra de sangue periférico. (200,256)

## 6 Conclusões

As neoplasias mieloproliferativas foram amplamente estudadas durante as últimas décadas, o que levou a um constante aprimoramento dos seus critérios de diagnóstico e classificação. Com os desenvolvimentos no campo da biologia molecular que permitiram a identificação das mutações nos genes, pode-se compreender melhor a fisiopatologia de cada NMP, bem como avaliar melhor as progressões e prognósticos de cada genótipo da doença. Com isso, a identificação das mutações não só contribuiu significativamente para o diagnóstico em tempo útil para o utente, mas também impactou no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Contudo, ainda que as análises moleculares sejam cada vez mais utilizadas como critério de diagnóstico, estas não são análises de fácil implementação. Isso acontece, principalmente, por se tratarem de técnicas complexas que necessitam de insumos e equipamentos de alto custo e de estrutura física especializada. Isso acaba por restringir o acesso a essas ferramentas na prática laboratorial mais usual.

Entretanto, a importância da compreensão detalhada das doenças hematológicas é fundamental. No que diz respeito às NMP, devido à propensão a transformação fibrótica e leucêmica, o tratamento deve ser rápido e a adequação do tratamento está profundamente relacionada com a clareza do diagnóstico, reforçando a importância das técnicas abordadas neste trabalho.

## 7 Referências Bibliográficas

1. UNILABS. Unilabs no Mundo [Internet]. 2018 [citado a 17 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.unilabs.pt/pt/a-unilabs/sobre-nos/unilabs-no-mundo>
2. UNILABS. Unilabs Portugal [Internet]. 2018 [citado a 17 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.unilabs.pt/pt/a-unilabs/sobre-nos/unilabs-portugal>
3. UNILABS. Unidades Unilabs [Internet]. 2018 [citado a 17 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.unilabs.pt/pt/unidades/6113>
4. UNILABS. Qualidade e Certificação [Internet]. 2018 [citado a 17 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.unilabs.pt/pt/a-unilabs/sobre-nos/qualidade-e-certificacao>
5. UNILABS. Manual da Qualidade. Lisboa: UNILABS; 2018.
6. UNILABS. Manual de Segurança e Saúde do Trabalho. Lisboa: UNILABS; 2018.
7. UNILABS. Manual de Colheita de Microbiologia Clínica. Lisboa: UNILABS; 2018.
8. ANVISA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde [Internet]. 2004 [citado a 23 de outubro de 2023]. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_microbiologia\\_completo.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf)
9. Biomerieux. CLED [Internet]. 2016 [citado a 24 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/search/product/cled>
10. Thermofisher. Sabouraud GC [Internet]. 2022 [citado a 23 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/MBD/Specification-Sheets/PS-PO5096A-V11.pdf>
11. UNILABS. Procedimento Urinas. Lisboa: UNILABS; 2018.
12. Moreira J, Carvalho C, Frota C. Visualização bacteriana e colorações [Internet]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2015 [citado a 23 de outubro de 2023]. Disponível em: [https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/16672/1/2015\\_liv\\_jlbmoreira.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/16672/1/2015_liv_jlbmoreira.pdf)
13. ELITECHGROUP. Aerospray Gram [Internet]. 2020 [citado a 25 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://brochures.page.link/Aerospray-Gram>
14. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. Capítulo 16.
15. Silva M. Bioquímica Clínica II: Introdução às aulas laboratoriais II. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2022. Report No: 3ª Aula Teórica.
16. Sysmex. Catálogo Serie UN [Internet]. 2011 [citado a 27 de outubro de 2023]. Disponível em: [https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/SERIE\\_UN\\_newlayout\\_PT\\_v04\\_low.pdf](https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/SERIE_UN_newlayout_PT_v04_low.pdf)
17. UNILABS. Procedimento Contagem minutada. Lisboa: UNILABS; 2018.
18. Salubris. Instrução de uso do Mycoprosafe [Internet]. 2019 [citado a 26 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://salubrisinc.com/wp-content/uploads/2020/06/Mycoprosafe-UserManual-1.pdf>
19. ELITECHGROUP. Aerospray TB [Internet]. 2020 [citado a 26 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://brochures.page.link/Aerospray-TB>

20. Portugal I. Bacteriologia Clínica: Mestrado em Análises Clínicas. Lisboa; 2022. Report No: 18ª Aula Teórica – Diagnóstico laboratorial de Tuberculose.
21. Neogen. Meio Lowenstein-Jensen [Internet]. 2010 [citado a 26 de outubro de 2023]. Disponível em: [https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7245\\_pt\\_pi.pdf](https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7245_pt_pi.pdf)
22. Bento J, et al. Métodos diagnósticos em tuberculose. Acta Med Port. 2011;24(1):145-54.
23. UNILABS. Procedimento Urinas 1º jato. Lisboa: UNILABS; 2018.
24. UNILABS. Procedimento Mycoplasma. Lisboa: UNILABS; 2018.
25. Biomerieux. IST 3 [Internet]. 2022 [citado a 28 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/search/product/mycoplasma>
26. Coris BioConcept. Esquema da técnica de Legionella K-Set [Internet]. 2022 [citado a 28 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://ifu.corisbio.com/corisbio/all?keycode=COR58151>
27. Abbot. Utilização prevista BinaxNow Streptococcus pneumoniae [Internet]. 2020 [citado a 28 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://ensur.invmed.com/ensur/broker/ensurbroker.aspx?code=IN710050&cs=26678443>
28. Biomerieux. Gelose de Chocolate [Internet]. 2017 [citado a 30 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/search/product/chocolate>
29. OSOM. Trichomonas Rapis Test [Internet]. 2021 [citado a 30 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://sekisuidiagnostics.com/wp-content/uploads/2023/01/OSOM-Trichomonas-IFU-Multilingual-3110-7.pdf>
30. COPAN. Instruções de uso eSwab [Internet]. 2020 [citado a 20 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.copanusa.com/wp-content/uploads/2024/01/HPC030C-PI-ESWAB-USA-Rev.03-Date-2020.08.pdf>
31. Biomerieux. Gelose VCAT [Internet]. 2017 [citado a 02 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/ODY2NjY0MzgsUGFja2FnZSBJbnNlcnQgLSAwNDU4ODYwMSAtIGZyIC0gNDM2MTEucGRmLFBj>
32. Biomerieux. Gelose Sangue [Internet]. 2015 [citado a 02 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/NzQ5MzYzNDksUGFja2FnZSBJbnNlcnQgLSAxMjA2NTAgLSBDIC0gZW4gLSBBRUlxMjA2NTAucGRmLFBj>
33. UNILABS. Procedimento Espermocultura. Lisboa: UNILABS; 2018.
34. UNILABS. Procedimento Pesquisa de *S. agalactiae*. Lisboa: UNILABS; 2018.
35. Biomerieux. Caldo Todd Hewitt Broth [Internet]. 2022 [citado a 02 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MjUwNTQ1MzI3LFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDYxMjM3LTAxIC0gZW4gLSA0MjExNi5wZGYsUEk=>
36. Biomerieux. Gelose CHROMID Strepto B [Internet]. 2017 [citado a 02 de novembro de 2023]. Disponível em:

<https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/NzE1NDgzNjcsUGFja2FnZSBJbnNlcnQgVVMgLSAyMTg4NSAtIEEgLSBibAtIDQxOTc1MS5wZGYsUEk=>

37. UNILABS. Procedimento Exsudado oftálmico. Lisboa: UNILABS; 2018.
38. Biomerieux. Gelose MacConkey [Internet]. 2009 [citado a 03 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MjE4NjA1NTYsUGFja2FnZSBJbnNlcnQgLSAxNDU4MC>
39. Biomerieux. Caldo de Soja [Internet]. 2019 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MTEyNDU3NTY1LFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDUxOTA5LTAxIC0gZW4gLSBBRUlxMjI4NTggLSBBRUlxMjI4NTkgLSBBRUlxMjI4NjkgLSBBRU1MjI4NTkgLSBBRU1MjI4NjAucGRmLFBj>
40. Coris BioConcept. Esquema da técnica Adeno Respi K-SeT [Internet]. 2023 [citado a 05 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://ifu.corisbio.com/corisbio/all?keycode=COR5809#:~:text=Portugu%C3%AAs/pt-,%2D,-Portuguese>
41. UNILABS. Procedimento Exsudado auricular. UNILABS Lisboa; 2018.
42. Biomerieux. Columbia CNA [Internet]. 2023 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/NzcyMTI5NTEsUGFja2FnZSBJbnNlcnQgLSAwNDU1NjIwMSAtIGVulC0gNDMwNzEgLSA0MzA3OS5wZGYsUEk=>
43. LABORCLIN. Disco de Bacitracina [Internet]. 2019 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/03/640602-BACITRACINA-BA-ESTREPTOCOCO-FR-25DISCOS.pdf>
44. ACRO Biotech. Strep A Test Cassete [Internet]. 2017 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: [https://www.biosigma.com/datasheet/BS715\\_TDS.pdf](https://www.biosigma.com/datasheet/BS715_TDS.pdf)
45. Biomerieux. Ágar CHROMID MRSA [Internet]. 2023 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MzMzNDYxNDM5LFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDU2Mjk0LTAxIC0gZW4gLSA0MzQ1MS00MzQ1OS5wZGYsUEk=>
46. Coris BioConcept. Esquema da técnica Influenza A+B K-SeT [Internet]. 2023 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://ifu.corisbio.com/corisbio/all?keycode=COR5812#:~:text=Portugu%C3%AAs/pt%20%2D-,Portuguese,-21/02/2023>
47. Coris BioConcept. Esquema da técnica RSV K-SeT [Internet]. 2023 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://ifu.corisbio.com/corisbio/all?keycode=COR5806#:~:text=Portugu%C3%AAs/pt%20%2D-,Portuguese,-21/02/2023>
48. UNILABS. Procedimento Exsudado Superficiais e Profundos. UNILABS Lisboa; 2018.

49. Biomerieux. Gelose Chapman [Internet]. 2017 [citado a 15 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/ODM4ODUzMzYsUGFja2FnZSBJbnNlcnQgLSAwNDYyMDUwMSAtIHB0IC0gNDM2NzEucGRmLFBj>
50. IKA. Folheto informativo Ultra Turrax [Internet]. 2012 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1alpNKO6gqfK71NCyTu5BXPw6tST9sp5I/view>
51. UNILABS. Procedimento Pesquisa de Bactérias Anaeróbias. UNILABS Lisboa; 2018.
52. Biomerieux. GENbag [Internet]. 2019 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MzQ5MzQyMDYwLFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDY3NjU1LTAxIC0gZW4gLSA0NTUzMiAtIDQ1NTMzIC0gNDU1MzQucGRmLFBj>
53. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged Incubation and Extensive Subculturing Do Not Increase Recovery of Clinically Significant Microorganisms from Standard Automated Blood Cultures. *Clinical Infectious Diseases*. 2005 Dec 1;41(11):1677–80.
54. Biomerieux. Manual do utilizador – BactAlert [Internet]. 2015 [citado a 10 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/NjczMDYyNDksVXNlciBjY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMTQ4MzU1LTAxIC0gZW4gLSA0NTUzMiAtIDQ1NTMzIC0gNDU1MzQucGRmLFBj>
55. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*. 1977;296:1305-9.
56. Santos P, Freitas S. Derrame Pleural de etiologia infecciosa. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2011. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/31199/1/Derrame%20pleural%20de%20etiologia%20infecciosa.pdf>
57. UNILABS. Procedimento LCR. UNILABS Lisboa; 2018.
58. UNILABS. Procedimento Fezes. UNILABS Lisboa; 2018.
59. Biomerieux. Ágar XLD [Internet]. 2016 [citado a 20 de novembro de 2023].. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/ODM5MjMxNzUsUGFja2FnZSBJbnNlcnQgLSAwNDU4ODUwMSAtIGVulC0gNDM1NjMgLSA0MzU2NC5wZGYsUEk=>
60. Biomerieux. Ágar Campyloset [Internet]. 2016 [citado a 20 de novembro de 2023].. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/ODEzMTc1MDQsUGFja2FnZSBJbnNlcnQgLSAwNDU4NzgwMSAtIGVulC0gNDMzNjEucGRmLFBj>
61. Biomerieux. Caldo Rappaport [Internet]. 2023 [citado a 20 de novembro de 2023].. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MzM1ODQ3NTkwLFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDQ5OTkyLTAyIC0gZW4gLSA0MjA5MS5wZGYsUEk=>
62. UNILABS. Procedimento Campylobacter. UNILABS Lisboa; 2018.
63. Araújo T. Métodos rápidos de diagnóstico em parasitologia clínica [Internet]. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Disponível em: [https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/54795/1/TM\\_Teresa\\_Araujo.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/54795/1/TM_Teresa_Araujo.pdf)

64. Biosepar. Instruções ParasiTrap. Bula; 2023. Biosepar.
65. Certest. Instruções Salmonella [Internet]. 2018 [citado a 11 de novembro de 2023]. Disponível em: [https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/07/IU-SA8V-v.05\\_web.pdf](https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/07/IU-SA8V-v.05_web.pdf)
66. O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. Clostridium difficile infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. Gastroenterology. 2009;136(6):1913-24.
67. Lopes A. Relatório de estágio Mestrado de Análises Clínicas [Internet]. Universidade de Coimbra; 2015. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/31000/1/Tese%20Ana%20Filipa%20Lopes.pdf>
68. Eco Diagnóstica. Instruções Toxin/GDH Eco Teste. Bula; 2023. Eco Diagnóstica.
69. Certest. Instruções Crypto+Giardia [Internet]. 2020 [citado a 12 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://www.certest.es/wp-content/uploads/2020/07/IU-NW88V-v.00.pdf>
70. Certest. Instruções Helicobacter pylori [Internet]. 2018 [citado a 12 de novembro de 2023]. Disponível em: [https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/07/IU-P8V-v.10\\_web.pdf](https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/07/IU-P8V-v.10_web.pdf)
71. Certest. Instruções Rotavírus [Internet]. 2019 [citado a 12 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/02/IU-R8V.pdf>
72. Certest. Instruções Adenovírus [Internet]. 2013 [citado a 13 de novembro de 2023]. Disponível em: [https://www.certest.es/wp-content/uploads/2014/10/IU-AD8V\\_web.pdf](https://www.certest.es/wp-content/uploads/2014/10/IU-AD8V_web.pdf)
73. Certest. Instruções Astrovírus [Internet]. 2019 [citado a 13 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/02/IU-AT8V.pdf>
74. Certest. Instruções Norovírus [Internet]. 2019. Disponível em: [https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/02/CerTest\\_IU-NN8V-rev.02.pdf](https://www.certest.es/wp-content/uploads/2019/02/CerTest_IU-NN8V-rev.02.pdf)
75. Cerdeira A. Detecção de Enterobacteriaceae produtoras de beta lactamases de espectro alargado em isolados clínicos urinários do ambulatório e isolados responsáveis por colonização fecal na zona Noroeste de Portugal [Internet]. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2012. Disponível em: [https://sigarra.up.pt/ffup/pt/pub\\_geral.show\\_file?pi\\_doc\\_id=13308](https://sigarra.up.pt/ffup/pt/pub_geral.show_file?pi_doc_id=13308)
76. Biomerieux. Ágar CHROMID Carba [Internet]. 2022 [citado a 08 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MjUxODM2MzEwLFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IFVTIC0gMDQ4NTE1LTAyIC0gZW4gLSA0MTQwMTIgLSDQVJCLnBkZixQSQ==>
77. DGS. Avaliação de risco e rastreio de *Enterobacterales* produtores de carbapenemases (EPC) e de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) à Admissão Hospitalar e durante o Internamento. Norma Clínica: 004/2023. Disponível em: <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0042023-de-290520231.aspx>
78. Biomerieux. Ágar CHROMID ESBL [Internet]. 2016 [citado a 08 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/NzI0NDQ2NTgsUGFja2FnZSBjb3RlcnQgLSAyMTYyMiAtIEIgLSDIbiAtIDQxNjk4NS5wZGYsUEk=>

79. Ferreira J. Micologia Clínica: Mestrado em Análises Clínicas. Lisboa; 2022. Report No: 20ª Aula Teórica– Dermatofitos – Diagnostico laboratorial.
80. Lopes M, José C. Micologia Clínica: Mestrado em Análises Clínicas. Lisboa; 2022. Report No: 1ª Aula Laboratorial – Manipulação e identificação de leveduras.
81. Lopes M, José C. Micologia Clínica: Mestrado em Análises Clínicas. Lisboa; 2022. Report No: 3ª Aula Laboratorial – Manipulação e identificação de filamentosos.
82. Lopes M. Micologia Clínica: Mestrado em Análises Clínicas. Lisboa; 2022. Report No: 1ª Aula Laboratorial – Manual de laboratório de micologia clínica.
83. Bilecen K, Yaman G, Ciftci U, Laleli Y. Performances and Reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF Mass Spectrometry Systems for the Identification of Clinical Microorganisms [Internet]. BioMed Research International; 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4697076/pdf/BMRI2015-516410.pdf>
84. UNILABS. Procedimento Maldi-Tof. UNILABS Lisboa; 2018.
85. Biomerieux. Manual Vitek 2 [Internet]. 2020. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MTI4NTU4NzI3LFVzZXIlgTWfudWFsIC0gMDQxMzg3LTAYlC0gZW4gLSAyMDIwLTA0IC0gVklURUsGmiBjbnN0cnVtZW50IFVzZXIlgTWfudWFsLnBkZixVTQ==>
86. UNILABS. Procedimento Vitek. UNILABS Lisboa; 2018.
87. BeckmanCoulter. Painéis MicroScan [Internet]. 2021 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://media.beckmancoulter.com/-/media/diagnostics/products/microbiology/conventional-panels/docs/microscan-gram-neg-and-pos-panel-ous.pdf?rev=c8b503406d6549e09f4d6f9579917c90>
88. BeckmanCoulter. Manual do utilizador Microscan Walkaway 96 Plus. BeckmanCoulter; 2015.
89. Biomerieux. AST-426 [Internet]. 2021 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MjI0NzYxOTQ3LFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDU5MTY3LTAxIC0gZW4gLSA0MjQxOTUucGRmLFBj>
90. Biomerieux. AST-373 [Internet]. 2017 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/ODMzMDA4ODQsUGFja2FnZSBjbnNlcnQgLSAwNDkzOTctMDEgLSBBIC0gZW4gLSA0MjMwMDcucGRmLFBj>
91. Biomerieux. AST-P648 [Internet]. 2018 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/OTE0MzlwMDYsUGFja2FnZSBjbnNlcnQgLTAA0NTMyOS0wMiAtIGVulC0gNDIwODU3LnBkZixQSQ==>
92. Biomerieux. AST-P586 [Internet]. 2018 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MjU5NDY2NjIzLFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDQ1NTEwLTAxIC0gZW4gLSAyMjIwLTA0IC0gVklURUsGmiBjbnN0cnVtZW50IFVzZXIlgTWfudWFsLnBkZixVTQ==>

93. Biomerieux. AST-ST03 [Internet]. 2021 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/Mjk3OTQ4NjgxLFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDQ2Njk4LTAzIC0gZW4gLSA0MjEwNDAucGRmLFBj>
94. Biomerieux. Agar Mueller Hinton [Internet]. 2022 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MjU3MDY3NzM3LFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDQzMjU0LTA0IC0gZW4gLSA0MTM4MjlgLSA0MTM4MjQgLSA0MTM4MjUucGRmLFBj>
95. Biomerieux. Agar Mueller Hinton com 5% de sangue de cavalo +20 mg/L de  $\beta$ -NAD [Internet]. 2022 [citado a 09 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/MjcxOTI0NDIwLFBhY2thZ2UgSW5zZXJ0IC0gMDQzMjU0LTA2IC0gZW4gLSA0MzkwMSAtIDQzOTA0IC0gNDM5MTkucGRmLFBj>
96. Biorad. Fungitest [Internet]. 2022 [citado a 11 de dezembro de 2023]. Disponível em: [https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/60780\\_881060\\_EN.pdf](https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/60780_881060_EN.pdf)
97. UNILABS. Procedimento Fungitest. UNILABS Lisboa; 2018.
98. Siemens Healthineers. Atellica Sample Handler: Visão Geral do Hardware PEP to Go [Internet]. 2018 [citado a 15 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://pep.siemens-info.com/assets/pdf.js/web/viewer.html?file=https://content-pep.siemens-info.com/CMS/PDFs/c0807ee1-fc06-443f-84d6-5be7f5284329.pdf>
99. Siemens Healthineers. Atellica Analisador CH: Visão Geral do Hardware PEP to Go [Internet]. 2018 [citado a 15 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://pep.siemens-info.com/assets/pdf.js/web/viewer.html?file=https://content-pep.siemens-info.com/CMS/PDFs/e17def8d-2240-4f05-bdc6-aafe8d77153f.pdf>
100. Mendes M. Metodologias Analíticas: Absorção Molecular de Ultravioleta e Visível. Mestrado em Análises Clínicas. Lisboa; 2021. Report No: 3ª Aula Teórica.
101. Siemens Healthineers. Multissensor Integrado A-LYTE (IMT Na K Cl) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671827>
102. Siemens Healthineers. Atellica Analisador IM: Visão Geral do Hardware PEP to Go [Internet]. 2018. Disponível em: <https://pep.siemens-info.com/assets/pdf.js/web/viewer.html?file=https://content-pep.siemens-info.com/CMS/PDFs/c9940d79-3906-42a2-87cf-e2dfc82adb9f.pdf>
103. Natrajan A. Meeting Evolving Clinical Demands for Assay Performance: Advances in Acridinium Ester Technology on the ADVIA Centaur Systems [Internet]. Siemens Healthcare Diagnostics, Advanced Technology and Pre-Development; 2012. Disponível em: <https://cdn0.scrvt.com/39b415fb>
104. Silva M. Bioquímica Clínica I: Glúcidos em Bioquímica Clínica. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 5ª Aula Teórica.
105. Siemens Healthineers. Glicose Hexoquinase\_3 (GluH\_3) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=763339>.
106. UNILABS. Prova de Tolerância a Glicose. UNILABS Lisboa; 2018.

107. Administração Central do Sistema de Saúde, IP. Valores Laboratoriais de Referência (ADULTOS) [Internet]. 2023. Disponível em: [https://www.acss.min-saude.pt/wp-content/uploads/2018/09/218-23\\_ACSS\\_Tabela\\_final.pdf](https://www.acss.min-saude.pt/wp-content/uploads/2018/09/218-23_ACSS_Tabela_final.pdf).
108. Siemens Healthineers. Insulina (IRI) [Internet]. 2022. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=939774>.
109. Siemens Healthineers. Péptido C (CpS) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=982814>.
110. Direção-Geral da Saúde. Norma nº 002/2011- Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus [Internet]. 2011. Disponível em: <https://normas.dgs.min-saude.pt/2011/01/14/diagnostico-e-classificacao-da-diabetes-mellitus/>.
111. Silva M. Bioquímica Clínica I: Conceitos de Bioquímica. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 2ª Aula Teórica.
112. Silva M. Bioquímica Clínica I: Lípidos em Bioquímica Clínica. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 7ª Aula Teórica.
113. Siemens Healthineers. Colesterol\_2 (Chol\_2) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=763611>.
114. Siemens Healthineers. Colesterol LDL (LDLC) [Internet]. 2022. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=863589>.
115. Siemens Healthineers. Colesterol HDL (HDLC) [Internet]. 2022. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=863582>.
116. Siemens Healthineers. Triglycerides\_2 (Trig\_2) [Internet]. 2022. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=863610>.
117. Direção-Geral da Saúde. Norma nº 066/2011- Prescrição de Exames laboratoriais para avaliação de dislipidemias [Internet]. 2011. Disponível em: <https://normas.dgs.min-saude.pt/2011/12/30/prescricao-de-exames-laboratoriais-para-avaliacao-de-dislipidemias-no-adulto/>.
118. Silva M. Bioquímica Clínica I: Proteínas em Bioquímica Clínica. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 9ª Aula Teórica.
119. Siemens Healthineers. Proteína Total II (TP) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=763378>.
120. Siemens Healthineers. Urinary/Cerebrospinal Fluid Protein (UCFP) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=780551>.
121. Siemens Healthineers. Albumina (Alb) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671023>.
122. Siemens Healthineers. Proteína C- Reativa (RCRP) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=1029887>.

123. Figueira T. Alterações metabólicas e mitocondriais na analbuminemia congênita: estudos em ratos nagase analbuminêmicos-dislipidêmicos [tese]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2011. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/Busca/Download?codigoArquivo=451763>. Acesso em: 17 fevereiro de 2024.
124. Silva M. Bioquímica Clínica I: Avaliação bioquímica da função hepática em Bioquímica Clínica. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 12ª Aula Teórica.
125. Caquet R. Guia prático de Análises Clínicas. 1ª ed. Lisboa: CLIMEPSI; 2001.
126. Siemens Healthineers. Bilirrubina total\_2 (TBil\_2) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=744156>.
127. Siemens Healthineers. Bilirrubina direta 2 (DBil\_2) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=744130>.
128. Siemens Healthineers. Fosfatase alcalina concentrada (ALP\_2c) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671049>.
129. Siemens Healthineers. Gama-glutamil transferase (GGT) [Internet]. 2022. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=975199>.
130. Siemens Healthineers. Alanina Aminotransferase (ALT) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=762940>.
131. Siemens Healthineers. Aspartato Aminotransferase (AST) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=762966>.
132. Ravel R. Laboratório Clínico. 6ª ed. Mosby; 1995. p. 285-286.
133. Silva M. Bioquímica Clínica I: Avaliação bioquímica da função renal (A). Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 14ª Aula Teórica.
134. Siemens Healthineers. Azoto Ureico (UN\_c) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=763400>.
135. Siemens Healthineers. Creatinina\_2 (Crea\_2) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=672826>
136. Silva M. Bioquímica Clínica I: Avaliação bioquímica da função renal (B). Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 14ª Aula Teórica.
137. Siemens Healthineers. Ácido Úrico (UA) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=629922>
138. Siemens Healthineers. Microalbumina\_2 ( $\mu$ ALB\_2) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=980099>
139. Soveral G. Bioquímica Clínica I: Equilíbrio Hidro-Electrolítico. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 17ª Aula Teórica.

140. Siemens Healthineers. Multissensor Integrado A-LYTE (IMT NA K Cl) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=1027242>
141. Silva M. Bioquímica Clínica I: avaliação bioquímica da função gastrointestinal e pancreática. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 18ª Aula Teórica.
142. Siemens Healthineers. Amilase pancreática (PAmy) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=670788>
143. Siemens Healthineers. Lipase (Lip) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=677045>
144. Ravel R. Laboratório Clínico. 6ª edição. Mosby; 1995. Capítulo 21.
145. Siemens Healthineers. Creatina quinase (CK\_L) [Internet]. 2022. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=921754>
146. Siemens Healthineers. Lactato desidrogenase L-P (LDLP) [Internet]. 2022. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=970004>
147. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª edição. Elsevier; 2015. Capítulo 27.
148. Siemens Healthineers. Creatina Quinase MB (CKMB) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=980339>
149. Siemens Healthineers. Troponina I de alta sensibilidade (TnIH) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=1017173>
150. Siemens Healthineers. Mioglobina (MYO) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=980499>
151. Ravel R. Laboratório Clínico. 6ª edição. Mosby; 1995. Capítulo 3.
152. Siemens Healthineers. Ferro\_2 (IRON\_2) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=671293>
153. Siemens Healthineers. Transferrina (Trf) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=657888>
154. Siemens Healthineers. Capacidade Total de Ligação do Ferro (TIBC) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=692626>
155. Siemens Healthineers. Ferritina (Fer) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=982954>
156. Silva P. Bioquímica Clínica II: Metabolismo fosfo-cálcio. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2022. Report No: 20ª Aula Teórica.
157. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª edição. Elsevier; 2015. Capítulo 35.
158. Siemens Healthineers. Cálcio (Ca) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=658191>
159. Siemens Healthineers. Hormona paratiroideia intacta (PTH) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=1003819>

160. Siemens Healthineers. Vitamina D Total (VitD) [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=982005>
161. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª edição. Elsevier; 2015. Capítulo 37.
162. Siemens Healthineers. Fósforo Inorgânico (IP) [Internet]. 2020. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=743204>
163. Siemens Healthineers. Magnésio (Mg) [Internet]. 2019. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=677095>
164. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª edição. Elsevier; 2015. Capítulo 36.
165. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª edição. Elsevier; 2015. Capítulo 20.
166. Soveral G. Bioquímica Clínica I: Equilíbrio Ácido-Base. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021. Report No: 17ª Aula Teórica.
167. Ravel R. Laboratório Clínico. 6ª edição. Mosby; 1995. Capítulo 24.
168. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª edição. Elsevier; 2015. Capítulo 23.
169. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª edição. Elsevier; 2015. Capítulo 21.
170. Bethoney C. Method comparison of critical analytes on Siemens blood gas systems: RapidPoint 500 point-of-care analyzers versus RapidLab 1265 laboratory-based analyzers [Internet]. Siemens Healthcare Diagnostics, Advanced Technology and Pre-Development; 2014. Disponível em: [https://marketing.webassets.siemens-healthineers.com/d7d77db28e07b4ef/d8d2d1d97a77/method\\_comparison\\_of\\_blood\\_gas\\_systems\\_141425\\_rp500vsrl1265\\_white\\_paper\\_final.pdf](https://marketing.webassets.siemens-healthineers.com/d7d77db28e07b4ef/d8d2d1d97a77/method_comparison_of_blood_gas_systems_141425_rp500vsrl1265_white_paper_final.pdf)
171. Siemens Healthineers. Guia do Operador do sistema RapidPoint 500. [Internet]. 2023. Disponível em: <https://content.doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=842608>
172. Ravel R. Laboratório Clínico. 6º ed. Mosby; 1995. Capítulo 28.
173. Garry J. Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1C analyser. Clin Chem Lab Med. 2014. Disponível em: <http://bio-challenge.com/images/produit/diabete/Multicentre-Evaluation-of-the-Premier-Hb9210-HbA1c-Analyser-Clin-Chem-2014.pdf>
174. Ravel R. Laboratório Clínico. 6º ed. Mosby; 1995. Capítulo 22.
175. Gouveia M. Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas [Internet]. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2016. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/87749/2/164769.pdf>
176. Mendes J. Lítíase renal. [Internet]. 2014. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/31671/1/Litíase%20Renal.pdf>
177. Thermo Fisher Scientific. Introduction to Fourier transform infrared spectroscopy. [Internet]. 2022. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/brochures/introduction-fourier-transform-infrared-spectroscopy-br50555.pdf>
178. Serrazina D. Avaliação da exposição a metais pesados em trabalhadores da indústria mineira. [Internet]. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências da

- Universidade de Lisboa; 2017. Disponível em: [https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/30921/1/ulfc120836\\_tm\\_Daniela\\_Serrazina.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/30921/1/ulfc120836_tm_Daniela_Serrazina.pdf)
179. Analytik Jena. Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). [Internet]. 2018. Disponível em: [https://www.analytik-jena.com/products/chemical-analysis/elemental-analysis/icp-ms/?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAjwps-zBhAiEiwALwsVYW4IfAn57jeAtETftqnNHthocna1KGG3eTI5MD\\_OTv6jJ8RgBaQsRoCyRQQAvD\\_BwE](https://www.analytik-jena.com/products/chemical-analysis/elemental-analysis/icp-ms/?gad_source=1&gclid=CjwKCAjwps-zBhAiEiwALwsVYW4IfAn57jeAtETftqnNHthocna1KGG3eTI5MD_OTv6jJ8RgBaQsRoCyRQQAvD_BwE)
180. UNILABS. Procedimento para análise de metais por ICP-MS. UNILABS Lisboa; 2018.
181. UNILABS. Genética médica. [Internet]. 2023. Disponível em: <https://www.unilabs.pt/pt/servicos/especialidades/genetica-medica/servicos-e-exames>
182. CGC. Procedimento operativo – Verificação de amostras/ estudos do laboratório de genética. CGC, Porto; 2022.
183. Martinho A. ADN fetal livre no sangue materno e rastreio de aneuploidia fetal. [Internet]. 2017. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/82101/1/Ana%20Artinho.pdf>
184. UNILABS. Procedimento de inscrição de Rastreio Pré Natal. UNILABS Lisboa; 2018.
185. Gaw A. Bioquímica Clínica. 5ª ed. Elsevier; 2015. Capítulo 77.
186. PerkinElmer. Delfia/AutoDelfia PAPP-A/Free HCGB Dual DBS kit. [Internet]. 2021. Disponível em: [https://prenataltesting.perkinelmer.com/products/autodelfia\\_automatic\\_immunoassay\\_system/delfia\\_autodelfia\\_papp-a\\_free\\_hcgss\\_dual\\_dbs\\_kit](https://prenataltesting.perkinelmer.com/products/autodelfia_automatic_immunoassay_system/delfia_autodelfia_papp-a_free_hcgss_dual_dbs_kit)
187. UNILABS. Teste pré-natal não invasivo: teste de anomalias cromossómicas. [Internet]. 2023. Disponível em: <https://www.unilabs.pt/pt/unilabs/novidades-unilabs/blog/rastreio-pre-natal-nao-invasivo>
188. Santos A. Diagnóstico Pré-Natal não invasivo [Internet]. Relatório de estágio de mestrado em Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra; 2021. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/98175/1/Dissertação%20Final%20-%20Alexandra%20Maria%20dos%20Santos.pdf>
189. UNILABS. Formulário de requisição Tomorrow. UNILABS. Porto; 2020.
190. Seixo J. Laboratório de Citogenética [Internet]. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2018. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/118622/2/311511.pdf>
191. Wieacker P, Steinhard J. The Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases. Deutsches Ärzteblatt International. 2010;107:857-62.
192. Binns V, Hsu N. Prenatal Diagnosis. eLS. John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
193. Lopes V. Relatório de Estágio de Mestrado em Análises Clínicas. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2010. Disponível em: [https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/15304/1/Relatorio\\_Final\\_MAC\\_Vera\\_Lopes.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/15304/1/Relatorio_Final_MAC_Vera_Lopes.pdf)

194. Alberts B, et al. Molecular biology of the cell. 2nd ed. New York: Garland Publishing, Inc.; 1989. Capítulo 4.
195. CGC. Procedimento operativo – Cultura em suspensão – Não estimulada. CGC, Porto; 2010.
196. CGC. Procedimento operativo – Stimulated Lymphocyte Chromosome Analysis. CGC, Porto; 2019.
197. CGC. Procedimento operativo – Non Stimulated Lymphocyte Chromosome Analysis. CGC, Porto; 2019.
198. CGC. Procedimento operativo – Fibroblasts Chromosome Analysis. CGC, Porto; 2019.
199. Braggio E, Renault IZ. Alterações moleculares no Mieloma Múltiplo. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007 Mar;29(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000100004>
200. CGC. Procedimento operativo – Fluorescence In Situ Hybridization (Fish) Analysis. CGC, Porto; 2022.
201. MRC Holland. MLPA General Protocol. 2022. Disponível em: <https://support.mrcholland.com/downloads/files/26/download>
202. CGC. Procedimento operativo – Estudo cromossómico em array (Matriz CGH). CGC, Porto; 2022.
203. CGC. Procedimento operativo – PCR. CGC, Porto; 2018.
204. Qiagen. Intruções de utilização do QIASymphony DSP DNA (Manual). Qiagen; 2015. [Internet]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/au/resources/download.aspx?id=8bc88dad-4140-467e-a1f0-e390fd193865&lang=pt-PT>
205. Marques M. Gestão e Qualidade laboratorial: Fase Pós-analítica. Mestrado em Análises Clínicas – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2022. Report No: 11ª Aula Teórica
206. Jaffe ES, International Agency For Research On Cancer, Organizació Mundial De La Salut, Al E. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001. Capítulo 1.
207. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia. 2022 Jun 22;36(7):1703-19. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01613-1#Tab1>
208. Lorenzi TF. Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
209. Sanganalmath SK, Abdel-Latif A, Bolli R, Xuan YT, Dawn B. Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. Basic Research in Cardiology. 2011 May 4;106(5):709–33.
210. Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues IARC Press. Lyon: International Agency for Research On Cancer; 2017.
211. INGOH. Fique atento a esta causa de anemia: Mielofibrose. INGOH; 2022. [Internet]. Disponível em: <https://ingoh.com.br/fique-atento-a-esta-causa-de-anemia-mielofibrose/>

212. Chauffaille M de LLF. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* [Internet]. 2010 [citada em 23 de abril de 2024];32(4):308–16. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n4/aop90010.pdf>
213. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973 Jun;243(5405):290–3.
214. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* [Internet]. 2008 Dec 15;112(13):4808–17. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/112/13/4808?ssoc-checked=true>
215. Bagg A. Chronic Myeloid Leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2002 Feb;4(1):1–10.
216. Monte-Mór BCR, Costa FF. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2008;30:241–8.
217. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, Silvennoinen O, O’Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biology*. 2004;5(12):253.
218. Hu X, li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*;2021;6(1).
219. Bader MS, Meyer SC. JAK2 in Myeloproliferative Neoplasms: Still a Protagonist. *Pharmaceuticals*. 2022 Jan 28;15(2):160.
220. Karow A, Waller C, Reimann C, Niemeyer CM, Kratz CP: JAK2 mutations other than V617F: a novel mutation and mini review. *Leuk Res* 2008, 32:365-366.
221. Rawlings JS. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* ; 2004;117(8):1281–3.
222. Gou P, Zhang W, Giraudier S. Insights into the Potential Mechanisms of JAK2V617F Somatic Mutation Contributing Distinct Phenotypes in Myeloproliferative Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Jan 18;23(3):1013.
223. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo ST, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
224. Salgado ISR. Detecção de mutações nos genes JAK2 e MPL por high resolution melting. [internet]. Dissertação de Mestrado em Biologia Aplicada. Universidade de Aveiro; 2013. Disponível em: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/12628/1/Tese.pdf>
225. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer*. 2010 Oct 1;1(10):979–93.
226. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, et al. Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms: A Report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*; 2013;15(6):733–44.
227. Guijarro-Hernández A, Vizmanos JL. A Broad Overview of Signaling in Ph-Negative Classic Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers*. 2021;13(5):984.

228. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016 Mar 10;127(10):1307–16.
229. Imai M, Araki M, Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Hematology*. 2017;105(6):743–7.
230. Guglielmelli P, Calabresi L. The MPL mutation. *Cellular and Molecular Aspects of Myeloproliferative Neoplasms - Part A*. 2021;163–78.
231. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology*. 2014 Dec 5;2014(1):287–96.
232. Figueiredo IFCC. Neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL negativas: a propósito de um caso clínico. [internet]. Dissertação de Mestrado integrado em Medicina. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto; 2014. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/81844/2/37596.pdf>
233. Dameshek, W. Algumas especulações sobre as síndromes mieloproliferativas. *Sangue* **1951**, 6, 372–375.
234. Paes RAP, Vassallo J, Alves AC, Menezes Y, Siqueira SAC, Aldred VL, et al. Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2002 Jul;38(3):237–9. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/r3BZMsGtBpLCjWq64zZLmbB/?format=pdf&lang=pt>
235. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* [Internet]. 2009;114(5):937–51. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357394>
236. Zerbini MCN, Soares FA, Morais JC, Vassallo J, Velloso EDRP, Chauffaille M de LLF, et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2011 Dec;47(6):643–8. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/9jSNcmkmGpctG4bm7dWCnMc/>
237. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120301567?via%3Dihub>
238. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jun 22;36(7):1703–19. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01613-1#Sec3>

239. Htun HL, Lian W, Wong J, Tan EJ, Foo LL, Ong KH, et al. Classic myeloproliferative neoplasms in Singapore: A population-based study on incidence, trends, and survival from 1968 to 2017. *Cancer Epidemiology*. 2022;79:102175.
240. Roman E, Smith A, Appleton S, Crouch S, Kelly R, Kinsey S, et al. Myeloid malignancies in the real-world: Occurrence, progression and survival in the UK's population-based Haematological Malignancy Research Network 2004–15. *Cancer Epidemiology*. 2016;42:186–98.
241. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. 2008;112(1):45–52.
242. Orphanet: Leucemia mielóide crônica [Internet]. Orpha.net. 2007 [citado em 26 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/521?name=myeloid%20leukemia&mode=name>
243. Orphanet: Policitemia vera [Internet]. Orpha.net. 2010 [citado em 26 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.orpha.net/pt/disease/detail/729#:~:text=A%20incid>
244. Orphanet: Trombocitemia essencial [Internet]. Orpha.net. 2014 [citado em 26 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/3318?name=thrombocythemia&mode=name>
245. Orphanet: Mielofibrose primária [Internet]. Orpha.net. 2019 [citado em 26 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/824?name=Primary%20myelofibrosis&mode=name>
246. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rorke M, Mesa R, De Vocht F, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hematology*. 2014 Mar 11;89(6):581–7.
247. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2009 Apr 9;59(3):171–91.
248. Spivak JL. How I treat polycythemia vera. *Blood*. 2019;134(4):341–52.
249. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal A, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356:459-468.
250. Valente ACMM, Ribeiro RT. Diagnóstico hematológico e molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2021;53(4).
251. Swerdlow S. H. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
252. Pedrazzani FS. Impacto da análise molecular da mutação JAK2V617F no diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas crônicas de acordo com os critérios da OMS 2016. [internet]. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina; 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/157653/001016851.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- 253.** Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
- 254.** Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*; 2014;124(16):2507–13; quiz 2615.
- 255.** Chauffaille M de LLF. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010;32(4):308–16.
- 256.** Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*. 2018 Feb 9;8(2):15. doi: 10.1038/s41408-018-0054-y. PMID: 29426921; PMCID: PMC5807384.
- 257.** Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2410–4.
- 258.** Villafuerte-Gutiérrez P, Montserrat López Rubio, Herrera P, Arranz E. A Case of Myeloproliferative Neoplasm with BCR-FGFR1 Rearrangement: Favorable Outcome after Haploidentical Allogeneic Transplantation. *Case Reports in Hematology*. 2018 Dec 6;2018:1–4.
- 259.** Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 2023 Jun 26;98(9).
- 260.** SYSMEX. SYSMEX XN-550 [Internet]. 2024 [citado a 02 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XN-L-Series/Pages/XN-550.aspx>
- 261.** Sabadin AB, Junior JLL, Rocha SFG. Prurido como principal sintoma da Policitemia Vera: um relato de caso - Abordagem na Atenção Básica / Itching as the main symptom of Polycythemia Vera: a case report - Approach in Primary Care. *Brazilian Journal of Health Review*. 2021 Oct 5;4(5):20851–62.
- 262.** Leite AB, Silva HF, Nogueira OL. Trombocitemia Essencial. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2001 Apr;23(1).
- 263.** Rossi GC. Mielofibrose – Metaplasia Mieloide agnogênica. [internet]. Monografia de conclusão de curso de pós-graduação. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto; 2019. Disponível em: [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie\\_branca/outras\\_neoplasias\\_hematologicas/10-Mielofibrose-metaplasia-mieloide-agnogenica.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/outras_neoplasias_hematologicas/10-Mielofibrose-metaplasia-mieloide-agnogenica.pdf)
- 264.** Quintero, M. Leucemia neutrófilica crónica con tetrasomía. *Revista Colombiana de Cancerología*, 2004, 8.2: 40-44.

265. Mariana M, Alex Freire Sandes, Natália Morais Borges, Maria. Leucemia eosinofílica crônica com expressão do rearranjo FIP1L1-PDGFR $\alpha$ : relato de caso e revisão da literatura. Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia. 2010 Jan 1;32(2):177–80.
266. Farias MG, Lucena NP, Bó SD, Bittar CM, Castro Júnior CG, Gregianin LJ, et al. Leucemia mielomonocítica juvenil: relato de caso. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2010;32(2):173–6.
267. Policitemia Vera. Atlas de Hematologia. [Internet]. 2024 [citado a 02 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://hematologia.farmacia.ufg.br/p/23538-policitemia-vera>
268. Campbell PJ, Green AR. The Myeloproliferative Disorders. New England Journal of Medicine. 2006 Dec 7;355(23):2452–66.
269. American Society of Hematology. Image Bank. [Internet]. 2024 [citado a 02 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://imagebank.hematology.org/image/28479/chronic-neutrophilic-leucemia>
270. Cabrera AW. Leucemia neutrofílica crônica: reporte de caso. SCIENTIFICA [Internet]. 2012 [citado a 23 de julho de 2024]; 10(1): 33-37. Disponível em: [http://revistasbolivianas.umsa.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1813-00542012000100008&lng=es](http://revistasbolivianas.umsa.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1813-00542012000100008&lng=es).
271. American Society of Hematology. Image Bank. [Internet]. 2024 [citado a 02 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://imagebank.hematology.org/image/63277/chronic-eosinophilic-leukemia-with-fip111pdgfra>
272. PathologyOutlines. Chronic eosinophilic leukemia. [Internet]. 2024 [citado a 02 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/myeloproliferativecel.html>
273. Atlas del GECH. Leucemia mielomonocítica juvenil [Internet]. 2024 [citado a 02 de agosto de 2024]. Disponível em: [https://atlas.gechem.org/index.php?option=com\\_k2&view=item&id=1563:peripheral-blood-smear-in-a-case-of-juvenile-cmml&lang=en](https://atlas.gechem.org/index.php?option=com_k2&view=item&id=1563:peripheral-blood-smear-in-a-case-of-juvenile-cmml&lang=en)
274. Macedo LC, Silva DM. Aplicação das técnicas moleculares no diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas. SaBios-Revista de saúde e biologia .2018;12(1):57-65.
275. Greiner TC. Diagnostic Assays for the JAK2V617F Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders. American Journal of Clinical Pathology. 2006 May 1;125(5):651–3.
276. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. The Lancet. 2005 Mar;365(9464):1054–61.
277. Santos MM. Diagnóstico molecular em hemato-oncologia [Internet]. Relatório de estágio curricular no Mestrado de genética clínica laboratorial. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;2023. Disponível em: [https://estudogeral.uc.pt/retrieve/266566/Relatório%20de%20Estágio\\_MarianaSantos.pdf](https://estudogeral.uc.pt/retrieve/266566/Relatório%20de%20Estágio_MarianaSantos.pdf)
278. Steensma DP. JAK2 V617F in Myeloid Disorders: Molecular Diagnostic Techniques and Their Clinical Utility. The Journal of Molecular Diagnostics. 2006 Sep;8(4):397–411.

279. Ugozzoli I, Wallace R. Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*. 1991 Feb;2(1):42–8.
280. Fani Kalala, Antigoni Mamara, Ioannou M, Matthaïos Speletas. Transient Ischemic Attacks as the First Presentation of JAK2-V617F Positive Chronic Myeloproliferative Neoplasm. *Hematology Reports*. 2012 Jun 29;4(2):e12–2.
281. CGC. Procedimento operativo – PCR quantitativo (qPCR) em tempo real. CGC, Porto; 2017.
282. Wu Z, Zhang Y, Zhang X, Xu X, Kang Z, Li S, et al. A Multiplex Snapback Primer System for the Enrichment and Detection of JAK2V617F and MPLW515L/K Mutations in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *BioMed research international*. 2014 Jan 1;2014:1–11.
283. CGC. Procedimento operativo – Sequenciação automática por método de Sanger. CGC, Porto; 2018.
284. Furtado LV, Weigelin HC, Kojo S.J. Elenitoba-Johnson, Betz BL. A Multiplexed Fragment Analysis-Based Assay for Detection of JAK2 Exon 12 Mutations. 2013 Sep 1;15(5):592–9.
285. Yasin EB, Yasin A. FREQUENCY OF CLAR AND JAK2 MUTATIONS IN SUDANESE CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS WITH PHILADELPHIA-POSITIVE DISEASE. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2023 Aug 7;133–7.
286. Pennisi MS, Di Gregorio S, Tirrò E, Romano C, Duminuco A, Garibaldi B, et al. Additional Genetic Alterations and Clonal Evolution of MPNs with Double Mutations on the MPL Gene: Two Case Reports. *Hematology Reports*. 2023 May 23;15(2):317–24.
287. Serrati, S.; De Summa, S. ; Pilato, B. ; Petriella, D. ; Lacalamita, R. ; Tommasi, S. ; Pinto, R. Sequenciamento de próxima geração: Avanços e aplicações no diagnóstico de câncer. *Onco Visa There*. 2016, 9, 7355–7365.
288. CGC. Procedimento operativo – Sequenciação de multiplex PCR. CGC, Porto; 2016.
289. Ribeiro JCC, Silva MRR, Chauffaille M de LLF. Duas classes de mutação na evolução de policitemia vera para leucemia mielóide aguda. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009 Apr;31(2):115–7.
290. Reis R. Possível papel da deleção 20q11.21-13.32 em impedir a geração de células-tronco de pluripotência induzidas (IPSC). INCA [internet]. 2019 [citado a 26 de julho de 2024]; Disponível em: [https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/2743/1/Rafaela%20Reis\\_3.pdf](https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/2743/1/Rafaela%20Reis_3.pdf)