



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Daniela Sérgio Marques

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas
orientado pela Professora Doutora Teresa Dinis Silva e pelo Dr. Frederico
Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra**

Outubro de 2020

Joana Daniela Sérgio Marques

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Teresa Dinis Silva e pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020

Índice

Introdução.....	1
Caracterização do laboratório de estágio	1
1. Controlo de qualidade.....	2
2. Setor de Hematologia.....	5
2.1) Hemograma.....	6
2.1.1) Metodologia dos autoanalisadores e parâmetros.....	6
apresentados no hemograma	6
2.2) Esfregaço de sangue periférico e alterações mais comuns nos eritrócitos e nos leucócitos ..	9
2.3) Alterações patológicas dos eritrócitos.....	12
2.4) Alterações patológicas dos leucócitos e das plaquetas	14
2.5) Patologias hematológicas malignas	17
2.6) Velocidade de sedimentação (VS).....	22
2.6.1) Metodologia	22
2.6.2) Alterações associadas a patologias	22
2.7) Hemostase	23
2.7.1) Provas de coagulação sanguínea	24
2.8) Imunofenotipagem	28
2.8.1) Metodologia	29
3. Setor de Microbiologia.....	30
3.1) Processamento das amostras em geral	32
3.1.1) Exame bacteriológico	33
3.1.2) Exame micológico	43
3.1.3) Exame micobacteriológico	45
3.2) Identificação de microrganismos e Testes de suscetibilidade a antibióticos	46
3.2.2) Teste de Identificação e Teste de sensibilidade aos antibióticos pelo sistema Vitek® 2	50
3.2.3) Testes manuais de suscetibilidade aos antibióticos	51
3.3) Detecção de mecanismos de resistência aos antibióticos	52
3.4) Análise Molecular.....	54
3.5) Caso Clínico	55
4. Setor de Bioquímica	56
5. Setor Imunologia	57
Conclusão	59

Referências.....	60
Anexos.....	65

Índice de tabelas

Tabela 1: Parâmetros apresentados no hemograma, método utilizado pelo autoanalisador para a sua determinação e descrição do parâmetro.....	8
Tabela 2: Alterações mais comuns na série branca.....	11
Tabela 3: Classificação das anemias e causas mais associadas.....	12
Tabela 4: Principais equipamentos utilizados no Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra e respetiva função.....	31
Tabela 5: Parâmetros utilizados no setor de microbiologia para classificar os constituintes do sedimento urinário.....	35
Tabela 6: Critérios de Murray&Washington utilizados para classificar a amostra de expectoração.....	42
Tabela 7: Interpretação de esfregaços para pesquisa de bacilos-ácido-álcool-resistentes..	46
Tabela 8: Tipos de cartas utilizadas pelo sistema Vitek® 2, grupos de microrganismos que permitem identificar e respetiva densidade associada.....	51
Tabela 9: Tipo de cartas de TSA utilizadas pelo sistema Vitek® 2, grupo de microrganismos a que se destinam e respetivo volume a pipetar.....	51
Tabela 10: Principais equipamentos do Setor de Bioquímica, parâmetros determinados e respetivos métodos de determinação.....	57
Tabela 11: Principais equipamentos utilizados diariamente no setor de Imunologia e respetivo método de análise que utilizam.....	58
Tabela 12: Meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia.....	65

Índice de figuras

Figura 1: Forma correta de executar a técnica do esfregaço de sangue periférico.....	10
Figura 2: Algumas alterações eritrocitárias mais comuns a nível de tamanho e forma e respectivas causas.	11
Figura 3: Esfregaço de LLC.....	18
Figura 4: A) Meios CLED com presença e ausência de infeção urinária.....	34
Figura 5: Meio líquido BHI e placa de gelose COS, ambos utilizados na realização do exame bacteriológico de cateter.....	42
Figura 6: Esfregaço de expetoração com presença de Streptococcus sp e bacilos Gram negativo.....	44
Figura 7: Esquema utilizado pelo setor como guia para a identificação de bactérias.....	47
Figura 8: Esquema utilizado no Setor como guia para o procedimento de pesquisa de BLSE.....	55
Figura 9: Geloses MH para pesquisa de BLSE e CAT.....	54
Figura 10: Lábio edemaciado e com sinais de abscesso.....	57
Figura 11: Meios SCS reduzido com e sem crescimento de colónias de <i>Prevotella Intermedia</i>	56

Abreviaturas

ACTH - hormona adrenocorticotrófica (adrenocorticotropic hormone)

AL- anticoagulante lúpico

BA- basófilos

BHI- (caldo) cérebro-coração (brain heart infusion)

BAAR- bacilo-ácido-álcool-resistente

BLSE- beta lactamases de espectro alargado

CAT- teste para deteção de atividade de carbapenemases

CHUC- centro hospitalar da universidade de coimbra

CLED- (agar) cistina-lactose-deficiente em eletrólitos

CNA- (gelose) Columbia com sangue, colistina e ácido nalidíxico

COS- (gelose) Columbia

CRAB- hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões osteolíticas

DNA-ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

EDTA- ácido etilendiamino tetra-acético

EO-eosinófilos

FvW- fator de von-Willebrand

FI- fator intrínseco

GN- caldo para bactérias Gram negativas

GP- caldo para bactérias Gram positivas

HCT- hematócrito

HGB- hemoglobina

ICS- infeção da corrente sanguínea

ID- teste de identificação

IL-interleucina

IPO- Instituto Português de Oncologia

IPOCFG- Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

ISI- índice de sensibilidade internacional

ITU- infeção do trato urinário

KCS- (caldo) Schaedler com vitamina K3

KPC- carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)

LDL- lipoproteína de baixa densidade (low density lipoprotein)

LJ- (meio) Löwenstein Jensen

LLC- leucemia linfocítica crónica

LMC- leucemia mieloide crónica

LY- linfócitos

MCH- hemoglobina corpuscular média

MCHC- concentração da hemoglobina corpuscular média

MCV- volume corpuscular médio

MFP- mielofibrose primária

MGIT- tubo indicador do crescimento de micobactérias

MH- (gelose) Mueller-Hinton

MHF- (gelose) Mueller-Hinton para microrganismos fastidiosos

MIC- concentração inibitória mínima (minimum inhibitory concentration)

MO- monócitos

MPV- volume plaquetar médio

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

NAD- dinucleótido de nicotinamida adenina (nicotinamide adenine dinucleotide)

NDM- metalobetalactamase “New Delhi” (New Delhi metalobetalactamase)

NE- neutrófilos

NH- carta de identificação de *Neisseria* e *Haemophilus*

NK- células “natural killer”

NRBC- células vermelhas nucleadas (nuclear red blood cells)

OXA 48- (beta-lactamase) oxacillinase tipo 48

PCT- plaquetócrito

PCR- reação de polimerase em cadeia

PDW- amplitude de distribuição plaquetária

PLT- plaquetar

Ph- (cromossoma) Philadelphia

PTH- hormona paratiroideia

PVX- (gelose) PolyViteX

RBC- eritrócitos (red blood cells)

RDW- amplitude de distribuição eritrocitárias (red cell distribution width)

RET- reticulócitos

RIA- radioimunoensaio

RNI- razão internacional normalizada

RT-PCR- reação de polimerase em cadeia- transcriptase reversa (reverse transcription polymerase chain reaction)

RNA- ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

SCG2- (gelose) Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina

SCS- – (agar) Schaedler

SMD- síndrome mielodisplásica

SPC- serviço de patologia clínica

TE- trombocitemia essencial

THF-tetrahidrofolato

TIBC- capacidade total de fixação de ferro (total iron binding capacity)

TP- tempo protrombina

TSA- teste de suscetibilidade a antibióticos

TTPa- tempo de tromboplastina parcial ativada

TT- tempo de trombina

UFC- unidades formadoras de colónia

VCS- volume, condutividade, dispersão de luz

VS- velocidade de sedimentação

WBC- leucócitos

Resumo

O presente relatório de estágio foi elaborado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. O estágio teve lugar no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil com uma duração de 6 meses.

Neste relatório, são essencialmente apresentadas as metodologias, os autoanalisadores e as patologias mais comuns no Serviço de Patologia Clínica deste Hospital Oncológico, bem como algumas partes teóricas de modo a contextualizar os tópicos desenvolvidos. O serviço encontra-se dividido em 4 setores- Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia- sendo que os setores de Hematologia e de Microbiologia são o alvo de maior desenvolvimento. É ainda apresentado um caso clínico sobre um abscesso labial provocado por *Prevotella intermedia*.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Hematologia, Microbiologia, Oncologia.

Abstract

The present internship report was elaborated in the scope of Master's degree in Clinical Analysis. The internship took place in Clinical Pathology Service of Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil lasting 6 months.

This report essentially presents the most common methodologies, autoanalysers and pathologies in the Clinical Pathology Service of this Oncological Hospital, as well as some theoretical parts in order to contextualize the topics developed. The service is divided in 4 sectors-Hematology, Microbiology, Biochemistry and Immunology- with the Hematology and Microbiology sectors being the target for further development. A clinical case about a labial abscess caused by *Prevotella intermedia* is also presented.

Keywords: Clinical Analysis, Hematology, Microbiology, Oncology.

Introdução

No âmbito do Mestrado de Análises Clínicas tive a oportunidade de realizar um estágio curricular sobre o qual incide o presente relatório. O estágio teve a duração de seis meses e foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra Francisco Gentil, tendo como objetivo a perceção da rotina laboratorial, aplicar o conhecimento teórico adquirido e desenvolver novas competências de um ponto de vista profissional.

O cancro é uma das principais causas de mortalidade mundial e a segunda maior causa de morte em Portugal. (Silva, 2018) Quer os métodos de diagnóstico quer os tratamentos passaram por importantes avanços nas últimas décadas, possibilitando diagnósticos delicados, acompanhamento adequado da evolução ou regressão da doença e avaliação de prognósticos. Assim, o laboratório clínico tem um papel de extrema importância, em colaboração com o médico, no diagnóstico e monitorização da doença oncológica.

O presente relatório incide com maior detalhe nos Setores de Hematologia e de Microbiologia, onde são descritas as análises realizadas durante a minha permanência nos respetivos setores laboratoriais. Este relatório aborda ainda o funcionamento do controlo de qualidade de todos os setores e as metodologias utilizadas nos restantes setores do laboratório (Bioquímica e Imunologia).

Caracterização do laboratório de estágio

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) é uma instituição hospitalar que pertence ao Serviço Nacional de Saúde e que tem à sua responsabilidade o diagnóstico e o tratamento de doenças oncológicas.

O Serviço de Patologia Clínica (SPC), inserido nesta instituição de saúde, é dirigido pelo Doutor Frederico Monteiro Marques Valido, especialista em Patologia Clínica, e apoiado por uma equipa de profissionais constituída por: Médicos, Farmacêuticos especialistas em Análises Clínicas, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos de Análises Clínicas, Auxiliares de Saúde e Técnicos Administrativos. Este serviço está dividido em quatro setores: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia.

Aquando do registo do pedido de análises no sistema informático, é atribuído a cada utente um código de barras único para cada setor e com o qual as amostras desse utente se identificam.

No IPO de Coimbra, são os Técnicos de Análises Clínicas que são responsáveis pela colheita das amostras, quer na sala de colheitas do próprio SPC quer no Internamento, bem como a correta identificação das mesmas. Depois de colhidas e identificadas, as amostras seguem para os respetivos setores, acompanhadas das requisições médicas, onde são recebidas e registadas para de seguida se iniciar o seu processamento. Os resultados obtidos são validados, por Médicos especialistas em Patologia Clínica ou Técnicos Superiores especialistas em Análises Clínicas, tendo em conta o histórico do utente, os valores de referência e os possíveis tratamentos que possa estar a realizar e que podem influenciar os valores obtidos. Todos os resultados que suscitam dúvida por se afastarem dos valores de referência bem como do historial do doente são repetidos para confirmação.

I. Controlo de qualidade

Os laboratórios clínicos são um importante meio auxiliar nas decisões médicas, portanto a obtenção de resultados fidedignos, bem como a segurança e a qualidade do laboratório são de extrema importância.

De modo a reduzir o tempo entre o processamento da amostra e a obtenção dos resultados, bem como os erros associados ao processamento manual das amostras, os laboratórios têm vindo a tornar-se cada vez mais automatizados. (Oliveira e Fernandes, 2016) No entanto é necessário garantir que os autoanalisadores forneçam resultados reais. É aqui que entra o

controlo de qualidade, que consiste em analisar amostras comerciais, de valores conhecidos para os parâmetros em questão, e verificar se os resultados obtidos pelo autoanalisador estão dentro dos valores esperados.

O controlo de qualidade engloba as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica inicia-se com o pedido da(s) análise(s), passando pela obtenção de informações pertinentes acerca do utente, colheita adequada, identificação, armazenamento, transporte e receção das amostras biológicas. Esta fase, por ser a menos automatizada, é a mais suscetível aos erros humanos e tem sido apontada como a responsável pela maioria dos erros laboratoriais. A formação e educação continuadas dos profissionais que obtêm e manipulam as amostras biológicas é bastante relevante na diminuição dos erros que se verificam nesta fase. A fase analítica consiste nas determinações analíticas pelos autoanalisadores e a fase pós-analítica consiste na validação dos resultados pelos profissionais responsáveis. (Oliveira e Fernandes, 2016)

No Serviço de Patologia Clínica (SPC) do IPO de Coimbra, realizam-se dois tipos de controlo de qualidade: o controlo interno e o controlo externo. O controlo interno avalia a precisão e passa por analisar diariamente amostras-controlo em que se devem obter resultados dentro dos valores pré-estabelecidos. Já o controlo externo avalia a exatidão e implica a comparação regular dos resultados obtidos, para uma mesma amostra, entre os laboratórios de referência inscritos no programa de avaliação externa da qualidade. (Dias, Martins e Costa, 2018)

Diariamente são analisados, nos vários setores do SPC, controlos de qualidade internos de três níveis (baixo, normal e alto), com exceção do setor de Microbiologia. Se os valores obtidos não se aproximarem o mais possível, dentro de um dado intervalo de referência, dos valores esperados deve ser tomada uma das seguintes decisões: utilizar um calibrador para o analito em questão, proceder a uma lavagem do equipamento ou utilizar um novo lote de reagentes.

Os resultados dos controlos são apresentados em gráficos de Levey-Jennings que são interpretados segundo as regras de Westgard.

O SPC participa em dois programas de controlo externo: um internacional, o RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme) e um nacional, mediado pelo INSA (Instituto

Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge). Realizam-se uma ou duas vezes por ano, dependendo do setor. Mais uma vez, o setor de Microbiologia é exceção.

Relativamente ao setor de Microbiologia, o controlo de qualidade interno é realizado de cada vez que se utiliza um novo lote de placas de gelose ou de solução salina (utilizada para preparação de suspensões) com o objetivo de verificar se estas se encontram estéreis. No caso das placas de geloses estas são colocadas na estufa sem qualquer inóculo e no caso da solução salina o controlo realiza-se inoculando uma placa de gelose COS com a solução, pela técnica de inundação, que é depois colocada a incubar. O controlo de qualidade externo é realizado quatro vezes por ano para controlo bacteriológico e micológico e três vezes por ano para controlo parasitológico.

2. Setor de Hematologia

A hematologia é a ciência que se dedica ao estudo dos constituintes do sangue e das patologias associadas, permitindo confirmar ou excluir diagnósticos. (Turgeon, 2011)

Para o estudo é utilizado sangue total que é colhido em tubos específicos consoante seja para realização de hemograma ou de testes de coagulação sanguínea.

A hematopoiese trata-se do processo pelo qual se formam as células sanguíneas. Tem início em células estaminais pluripotentes que têm a capacidade de se dividir em linhagens celulares. As células precursoras respondem a fatores de crescimento hematopoiéticos que regulam a proliferação e diferenciação destas células até que se tornem células maduras do sangue. Nos adultos, a produção de células sanguíneas ocorre na medula óssea, estando esta produção confinada à parte central do esqueleto e às extremidades proximais do fêmur e úmero. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Os glóbulos vermelhos maduros têm a forma de disco bicôncavo e contêm uma proteína, a hemoglobina, que é responsável pelo transporte de oxigénio aos tecidos e células. O processo de produção dos glóbulos vermelhos denomina-se eritropoiese e é regulado pela eritropoietina, uma proteína produzida nos rins, e a sua concentração no sangue é inversamente proporcional à oxigenação dos tecidos. A vida média dos eritrócitos em circulação é de 120 dias.

Os glóbulos brancos podem dividir-se em 3 séries: granulocítica (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monocítica (monócitos) e linfocítica (linfócitos B e T). A diferenciação destas séries está relacionada com a estimulação de diferentes fatores de crescimento e interleucinas (IL). Os leucócitos podem também dividir-se em 2 grandes grupos: fagócitos e linfócitos. Os fagócitos incluem os granulócitos e monócitos e englobam as células que fazem parte da imunidade inata, já os linfócitos são responsáveis pela resposta imune adaptativa. Os linfócitos B, no estado final da sua maturação denominam-se plasmócitos e têm como função a produção de imunoglobulinas com capacidade para defender o organismo de agentes externos. Já as células T ajudam ou suprimem a ativação dos linfócitos B e depois de sensibilizados protegem contra infeções. Existem ainda as células NK (Natural Killer) que desempenham um efeito anti proliferativo em vírus e células malignas e que produzem uma citocina que ativa macrófagos.

Estas células são morfológicamente semelhantes a linfócitos, no entanto têm maiores dimensões e apresentam grânulos no citoplasma. (Turgeon, 2011)

As plaquetas têm entre 2 a 4 µm e são fragmentos do citoplasma dos megacariócitos, as maiores células encontradas na medula óssea, e são bastante importantes na manutenção da hemóstase. (Turgeon,2011)

As patologias hematológicas estão associadas a alterações nos componentes do sangue, pelo que essas alterações ajudam no diagnóstico e na monitorização das mesmas.

No SPC do IPO o sector de Hematologia está dividido em 2 salas: uma onde se realizam os hemogramas, a determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária e os esfregaços de sangue periférico (Hematologia I) e outra onde se realizam as provas de coagulação e a imunofenotipagem por citometria de fluxo (Hematologia II).

2.1) Hemograma

O hemograma trata-se de um exame de grande utilidade no apoio ao diagnóstico pois promove uma análise qualitativa e quantitativa das células sanguíneas e dos seus componentes. (Mejía-Saldarriaga *et al.*,2019)

Este exame é realizado por autoanalisadores que fornecem resultados céleres, sensíveis e precisos. A amostra de sangue é colhida para um tubo com anticoagulante que preserva as propriedades celulares, o EDTA. (Lippi *et al.*,2007)

Ainda que o auto analisador faça uma breve agitação da amostra antes de iniciar a sua aspiração, quando as amostras chegam ao setor e depois de devidamente registadas são colocadas num agitador para evitar que se dê a sedimentação dos glóbulos vermelhos.

Sempre que a amostra se apresenta coagulada deve ser realizada uma nova colheita.

2.1.1) Metodologia dos autoanalisadores e parâmetros apresentados no hemograma

No sector de Hematologia do IPO os hemogramas são realizados pelo autoanalisador DxH900 que faz a contagem de células por impedância elétrica, ou seja, pelo princípio de Coulter, que de

uma forma muito sucinta consiste na utilização de dois elétrodos de platina, sendo que um está mergulhado na solução de partículas a analisar e estão separados por um orifício por onde as partículas passam e deslocam um volume de líquido que modifica de forma mensurável e proporcional ao volume deslocado a corrente elétrica. O número de pulsos que se geram indica o número de partículas e a amplitude de cada um é proporcional ao volume da célula. Este princípio tem como base o facto de as células serem pobres condutores de eletricidade quando comparadas com a solução isotónica utilizada como meio de suspensão. Inicia-se o processo com a contagem dos eritrócitos e plaquetas num compartimento do autoanalisador, sendo que depois os eritrócitos são lizados com uma solução para permitir a contagem de leucócitos e a quantificação da hemoglobina. A diferenciação dos leucócitos é feita num compartimento diferente do utilizado para a contagem celular, através da tecnologia VCS (volume, condutividade e dispersão da luz) que avalia para cada tipo de célula a composição interna – volume nuclear, lobulação nuclear, granularidade e estrutura nuclear. (Bacall,2009)

Para a contagem de eritrócitos e plaquetas, o equipamento considera como plaquetas as células com tamanho entre 2-20 fL e como eritrócitos entre 36-360 fL. Os pulsos gerados são registados e representados num histograma para plaquetas e noutro para eritrócitos. Nestes histogramas o eixo do x representa o tamanho da célula (fL) e o eixo do y representa o total de eventos, ou seja, o número de células que foi contado. No caso do histograma eritrocitário, este compreende o número total de eritrócitos (RBC), o volume médio dos eritrócitos (MCV) e o coeficiente de variação do volume celular (RDW). Com estas informações o software agregado ao autoanalisador calcula então o hematócrito (HMT), a hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (MCHC). O histograma plaquetar compreende o número total de plaquetas (PLT), o volume plaquetar médio (MPV) e o coeficiente dispersão do volume (PDW) e através destes dados o software calcula o plaquetócrito (PCT). (Turgeon, 2011)

A fórmula leucocitária- contagem e diferenciação dos leucócitos- inicia-se então após a lise dos eritrócitos. São contados como leucócitos as células com tamanho superior a 35 fL. O histograma leucocitário é obtido pela classificação dos tamanhos dos diferentes subtipos de leucócitos, o que está relacionado com o tamanho do núcleo de cada um. Os resultados obtidos

pela tecnologia VCS são traduzidos num gráfico 3D que permite observar a dispersão da amostra. (Turgeon, 2011)

A tabela I apresenta os vários parâmetros do hemograma e a metodologia utilizada pelo autoanalisador para a obtenção dos mesmos.

Tabela I: Parâmetros apresentados no hemograma, tecnologia utilizada para a sua determinação e descrição do parâmetro.

Leucograma: contém o número total de leucócitos bem como o número das subpopulações quer em valor absoluto ($\times 10^3/\mu\text{L}$) quer em percentagem (%)	Parâmetro	Tecnologia	Descrição
	WBC	Princípio de Coulter	Leucócitos totais
	NE	Tecnologia VCS	Neutrófilos
	LY	Tecnologia VCS	Linfócitos
	MO	Tecnologia VCS	Monócitos
	EO	Tecnologia VCS	Eosinófilos
	BA	Tecnologia VCS	Basófilos
	NRBC	Tecnologia VCS	Células vermelhas nucleadas
Eritrograma: compreende a contagem total de eritrócitos, o hematócrito, a concentração da hemoglobina, os índices eritrocitários (MCV, MCH, MCHC) e o RDW.	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Princípio de Coulter	Valor absoluto de eritrócitos
	HGB (g/dL)	Espectofotometria (método da cianometahemoglobina)	Concentração de hemoglobina
	HCT (%)	Calculado	Hematócrito
	MCV (fL)	Deriva do histograma eritrocitário	Volume corpuscular médio
	MCH (pg)	Calculado	Hemoglobina corpuscular média
	MCHC (g/dL)	Calculado	Concentração média de hemoglobina corpuscular
	RDW (%):	Deriva do histograma eritrocitário	Coeficiente de variação do volume eritrocitário
	PLT($\times 10^3/\mu\text{L}$):	Princípio de Coulter	Número de plaquetas

Plaquetograma: permite analisar qualitativa e quantitativamente as plaquetas e apresenta os seguintes parâmetros	MPV (fL)	Deriva do histograma de plaquetas	Volume plaquetar médio
	PCT (%)	Calculado	Plaquetócrito
	PDW (%)	Deriva do histograma de plaquetas	Coefficiente de variação do volume plaquetar

Continuação da tabela I. Fonte: (Turgeon, 2011) (Coulter,2009)

Os **reticulócitos** são eritrócitos imaturos que perderam o núcleo, mas que ainda têm presentes alguns organelos, tais como mitocôndrias e ribossomas, e RNA. Enquanto o RNA está presente a síntese de proteínas e de hemoglobina continua. O reticulócito vai amadurecendo enquanto vai perdendo os ribossomas, as mitocôndrias e o RNA.

A quantidade de reticulócitos na medula óssea é igual à quantidade em circulação no sangue, em condições normais. Em casos em que a hematopoiese está comprometida ou em casos de anemia (como hemorragias graves), a percentagem de reticulócitos em circulação tende a aumentar- reticulocitose- indicando que o organismo está a tentar manter a homeostase. Se um doente anémico apresentar uma baixa percentagem de reticulócitos é indicativo de que a medula não está a responder de forma a corrigir a anemia. (Turgeon, 2011)

Este parâmetro não consta do hemograma, como tal só é feito quando o médico prescriptor o solicita.

A **contagem de reticulócitos** é feita utilizando um reagente- azul de metileno- que cora o RNA presente nestes e através da tecnologia VCS obtém-se um diagrama de dispersão de reticulócitos da amostra. O equipamento obtém de forma direta a percentagem de reticulócitos (%RET) através da tecnologia VCS. (Bain et al., 2011)

O analisador possui ainda alarmes caso detete células diferentes, nomeadamente, células vermelhas imaturas (NRBC), blastos, plaquetas gigantes ou agregados de plaquetas.

2.2) Esfregaço de sangue periférico e alterações mais comuns nos eritrócitos e nos leucócitos

No laboratório de Hematologia, o esfregaço de sangue periférico é realizado quando é necessário confirmar algum(ns) parâmetro(s) do Hemograma, quando o analisador não

apresenta a contagem devido à presença de células que não consegue identificar por considerar “anormais” e quando determinados valores obtidos no hemograma são alarmantes e não vão de encontro ao historial clínico do doente, principalmente em casos de leucócitos $>20 \times 10^3/\mu\text{L}$ e basófilos $>2\%$ ou de plaquetas anormalmente baixas ou elevadas. Quando o aparelho apresenta alarme de NRBC também se faz o esfregaço da amostra.

A técnica do esfregaço de sangue periférico (ilustrada na figura 1) consiste em colocar uma gota de sangue da amostra pretendida sobre uma lâmina e com a ajuda de outra lâmina (ou lamela) estender a gota de modo que na parte final seja possível obter uma zona menos densa onde será mais fácil observar o pretendido. O esfregaço depois de seco é corado automaticamente pela coloração de Wright-Giemsa em dispositivo próprio para o efeito, o Aerospray® HematologyPro, e posteriormente observado ao microscópio ótico na objetiva de 50x com óleo de imersão.

Os reagentes utilizados na coloração Wright-Giemsa são um fixador, um tampão e dois corantes- eosina e tiazina. A eosina é um corante ácido que cora de cor-de-rosa estruturas básicas das células como os grânulos dos eosinófilos ou os eritrócitos. Já a tiazina é um corante básico que cora de púrpura os núcleos dos leucócitos e os grânulos basofílicos e de azul o citoplasma dos monócitos e linfócitos. (Barcia, 2007)

Esta técnica permite fazer uma observação qualitativa e quantitativa das células presentes no sangue. É importante para evidenciar alterações na cor, forma (poiquilocitose) e tamanho (anisocitose) dos glóbulos vermelhos, alterações de tamanho e de núcleo nos glóbulos brancos e evidenciar a presença de aglomerados plaquetares ou plaquetas gigantes.

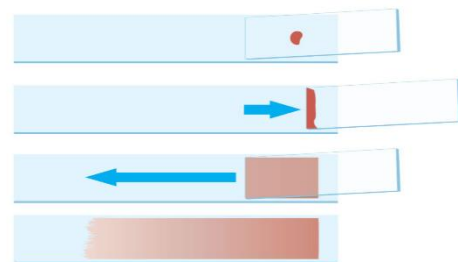


Figura 1: Forma correta de executar a técnica do esfregaço de sangue periférico. Fonte: <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia>

As alterações mais comuns nos glóbulos vermelhos são ao nível do tamanho, em que podem ser macrocíticos ou microcíticos e/ou ao nível da forma. Estas alterações estão esquematicamente representadas na figura 2.

Outras alterações:

- os glóbulos vermelhos podem ainda aglomerar-se sob a forma de "pilha de moedas", fenómeno denominado roeaux que ocorre em casos de Mieloma Múltiplo devido ao aumento de globulinas ou paraproteínas.

- alterações na cor: hipocromia devido a redução da hemoglobina; policromasia quando tem cor acinzentada por ser jovem e ter perdido o núcleo recentemente;

- por vezes aparecem precursores

eritróides no sangue periférico e neste caso observam-se glóbulos vermelhos nucleados.

Nos glóbulos brancos as alterações são essencialmente ao nível da morfologia e as mais comuns estão representadas na tabela 2.

Tabela 2: Alterações mais comuns na série branca.

Granulações tóxicas	O citoplasma apresenta muitos grânulos escuros e maiores que o normal. Pode ser devido a respostas a infeções ou a tratamentos.
Vacuolização	Típico de linfócitos e fagócitos ativados (infeções).
Segmentação do núcleo	Hiposegmentação ou hipersegmentação do núcleo. Ocorre normalmente em displasias ou anemias megaloblásticas, respetivamente.
Projeções citoplasmáticas	Linfócitos fusiformes, associados a alguns linfomas ou Tricolinfócitos, associados a Tricoleucemia.
Presença de precursores	Como consequência de anemias ou síndromes proliferativas podem aparecer no sangue periférico precursores linfóides ou mielóides.

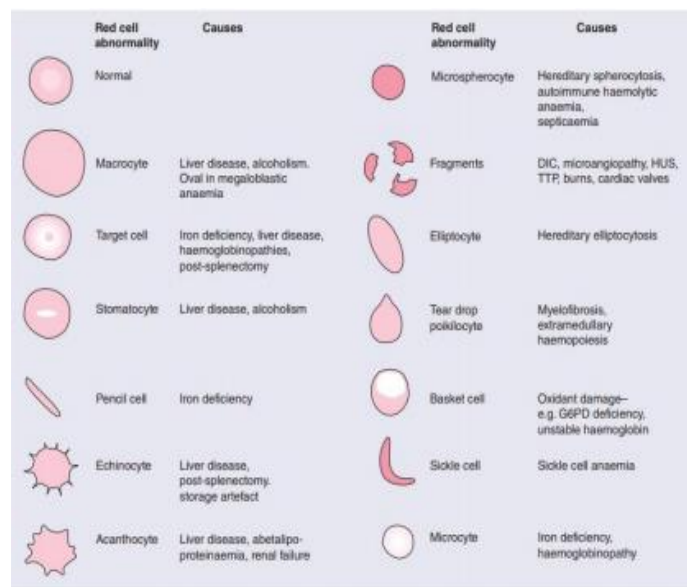


Figura 2: Algumas alterações eritrocitárias mais comuns a nível de tamanho e forma e respetivas causas. DIC- coagulopatia intravascular disseminada; G6PD- glucose-6-fosfato-desidrogenase; HUS- síndrome hemolítica urémica; TTP- púrpura trombocitopénica trombótica. Fonte: (Hoffbrand e Moss, 2018)

2.3) Alterações patológicas dos eritrócitos

Anemias

A anemia é definida como a diminuição da concentração de hemoglobina no sangue para além do limite inferior do intervalo de referência definido para a idade e o sexo. Estes intervalos de referência variam de laboratório para laboratório, mas tipicamente considera-se que valores abaixo de 13,5 g/dl nos homens e abaixo de 11,5 g/dl nas mulheres indicam anemia. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Os parâmetros a ter em conta para classificar as anemias são o MCV e o MCH. A tabela 3 apresenta um resumo dos tipos de anemias tendo em conta os parâmetros referidos.

No IPO é frequente que os pacientes apresentem valores de hemoglobina abaixo dos valores de referência devido aos tratamentos a que estão sujeitos, como tal o histórico do paciente tem sempre de ser tido em conta.

Tabela 3: Classificação das anemias e causas mais associadas.

Anemias microcíticas hipocrômicas	Anemias normocíticas normocrômicas	Anemias macrocíticas
MVC <80 fL MCH <27 pg	MCV 80-95 fL MCH ≥27 pg	MCV >95 fL
Deficiência de ferro (Anemia ferropénica); Talassémias; Anemia da doença crónica; Anemia sideroblástica.	Anemia de doença crónica; Anemia hemolítica; Perda aguda de sangue; Falência de medula óssea; Nefropatias.	Megaloblástica: deficiência de vitamina B12 e/ou ácido fólico; Não megaloblástica: Doença hepática, alcoolismo, mielodisplasia.

Fonte: (Hoffbrand e Moss,2018)

A **anemia microcítica hipocrômica** é então caracterizada pela presença de eritrócitos mais pequenos que o normal (microcíticos) e com uma tonalidade mais leve (hipocrômicos). A deficiência de ferro é a causa mais comum deste tipo de anemias, mas é necessário fazer o diagnóstico diferencial com as talassemias e com a anemia de doença crónica. Ao avaliar o ferro sérico e a capacidade total de fixação de ferro (TIBC)- estes parâmetros são avaliados no setor

de Bioquímica Clínica- constata-se que na anemia causada por uma doença crónica ambos estão diminuídos, na talassemia ambos estão normais e na anemia ferropénica o ferro sérico está diminuído e a TIBC está aumentada. Para além disto, na anemia provocada por deficiência de ferro os agregados de ferro na medula estão ausentes. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Nas **anemias normocíticas e normocrómicas** os valores de MVC e MCH estão dentro dos valores de referência. Neste tipo de anemia, a hemoglobina baixa pode ser explicada por: perda aguda de sangue; hemólise acentuada em que a taxa de lise de eritrócitos é maior que a taxa de produção destes; falha renal em que não há produção de eritropoietina comprometendo assim a eritropoiese, e ainda doenças crónicas. Quando a anemia é provocada por doenças crónicas normalmente trata-se de doenças com quadros inflamatórios associados e baixos níveis de ferro sérico. (Bain *et al.*, 2011)

Na anemia de doença crónica há aumento da atividade dos macrófagos devido a processo infeccioso, inflamatório ou neoplásico o que leva ao aumento da remoção dos glóbulos vermelhos em circulação. Em alguns casos, pode evoluir para anemia microcítica hipocrómica uma vez que o processo inflamatório tem a capacidade de aumentar a síntese e libertação de citocinas indutoras de alterações no metabolismo do ferro. É de notar que pacientes com anemia de doença crónica podem apresentar ferritina sérica aumentada uma vez que esta é uma proteína de fase aguda e como tal aumenta em infeções, não traduzindo a quantidade de ferro do organismo. (Cançado e Chiattonne, 2002)

Eritrócitos anormalmente grandes (macrócitos) caracterizam as **anemias macrocíticas**, que podem ser subdivididas em **megaloblásticas** e **não megaloblásticas** consoante o aspeto dos eritroblastos que se estão a desenvolver na medula óssea.

No caso das anemias classificadas como **megaloblásticas**, os eritroblastos na medula óssea apresentam um atraso da maturação do núcleo em relação à do citoplasma. A causa mais frequente desta assincronia é a deficiência de vitamina B12 ou de ácido fólico que causam uma falha na síntese de DNA. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Os folatos que advém da dieta são transformados em metil-tetrahidrofolatos (metil-THF) no intestino delgado e transportado até às células através do plasma. Nas células, a vitamina B12

converte o metil-THF em THF, necessário para a síntese de poliglutamatos de folato que são as formas intracelulares ativas do folato. (Hoffbrand e Moss, 2018)

No caso de haver uma deficiência de vitamina B12, há redução destas formas ativas do folato (coenzimas), o que origina defeitos na síntese do DNA pois o folato é necessário para a síntese de precursores purínicos do DNA. Estes defeitos dificultam a divisão celular na medula enquanto a síntese de RNA e de componentes celulares não sofre alterações, dando origem à macrocitose. Portanto, a deficiência de B12 tem um papel indireto na formação deficiente do DNA. (Paniz et al., 2005)

Uma causa da deficiência de vitamina B12 e conseqüentemente uma causa da anemia megaloblástica é a Anemia Perniciosa, uma anemia provocada por agressão autoimune da mucosa gástrica. O fator intrínseco (FI) torna-se ausente ou parcialmente ausente, o que baixa a absorção de vitamina B12. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Pacientes que sejam alvo de quimioterapia com Metotrexato, por exemplo, também podem desenvolver anemia macrocítica megaloblástica uma vez que este fármaco inibe a redução do tetrahydro-folato e provoca alterações na síntese do DNA. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Na observação do esfregaço de sangue periférico de pacientes com anemia megaloblástica é comum observarem-se neutrófilos hiperlobulados.

As anemias **não megaloblásticas** podem ter várias causas, no entanto o mecanismo responsável pela formação de eritrócitos grandes não está claro. O alcoolismo é uma das causas mais comuns para o aparecimento deste tipo de eritrócitos, mas hepatopatias, reticulocitose ou mieloma múltiplo pode estar também na origem destas anemias macrocíticas não megaloblásticas. (Hoffbrand e Moss, 2018)

2.4) Alterações patológicas dos leucócitos e das plaquetas

- **Neutrófilos**

Os neutrófilos têm como principal função no organismo a fagocitose e neutralização de agentes patogênicos. Apresentam um núcleo que pode ter entre 2-5 lóbulos e um citoplasma com grânulos.

A **neutrofilia**, ou seja, o aumento do número de neutrófilos em circulação na corrente sanguínea para valores acima de $7,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ é das alterações mais frequentes no hemograma. Pode ter como causas: infecções bacterianas; neoplasias; hemorragias ou hemólise aguda; processos inflamatórios; entre outras. Este aumento do número de leucócitos pode ainda estar relacionado com um “desvio à esquerda” da forma leucocitária provocado por aumento de neutrófilos em bastão e presença ocasional de células mais primitivas, como metamielócitos e mielócitos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Por outro lado, a **neutropenia** corresponde a uma contagem absoluta de neutrófilos abaixo do limite inferior de referência ($4,5 \times 10^3/\mu\text{L}$). Se a quantidade de neutrófilos baixa muito para além deste limite, o paciente está sujeito a infecções recidivantes. A neutropenia pode ter várias causas, como por exemplo, a administração de determinados fármacos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

A neutropenia é comum no IPO devido aos tratamentos de quimioterapia a que os pacientes estão sujeitos.

- **Monócitos**

Os monócitos são, geralmente, os leucócitos de maior tamanho e apresentam um núcleo grande e de forma variável. O citoplasma destas células costuma apresentar vacúolos e por vezes apresentam grânulos. A função dos monócitos é fagocitar agentes patogênicos.

O aumento de monócitos em circulação acima de $0,8 \times 10^3/\mu\text{L}$, denomina-se por **monocitose**. Esta situação não é frequente, no entanto pode dever-se a infecções bacterianas crónicas, neoplasias malignas, infecções por protozoários, entre outras. (Hoffbrand e Moss, 2018)

- **Eosinófilos**

Apresentam grânulos citoplasmáticos grandes que coram de vermelho-alaranjado intenso e o seu núcleo raramente apresenta mais do que 3 lóbulos. Os eosinófilos têm um papel essencial nas respostas alérgicas, na defesa contra parasitas e na remoção da fibrina formada durante a inflamação.

O aumento de eosinófilos no sangue para valores superiores a $0,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ denomina-se **eosinofilia** e pode surgir devido a patologias alérgicas, infecções parasitárias, tumores metastáticos com necrose tumoral, entre outras causas. (Hoffbrand e Moss, 2018)

- **Basófilos**

De entre os leucócitos, os basófilos são os mais escassos no sangue. No citoplasma apresentam numerosos grânulos escuros que contêm heparina e histamina.

A **basofilia**, ou seja, o aumento de basófilos no sangue, é incomum. No entanto, quando se verifica tem geralmente como causa uma neoplasia mieloproliferativa, como a leucemia mieloide crônica ou policitemia vera. (Hoffbrand e Moss, 2018)

- **Linfócitos**

Os linfócitos típicos apresentam um núcleo redondo ou oval, com cromatina densa, citoplasma azul e escasso. Podem apresentar alguns grânulos o que pode ser indicativo de se tratar de linfócitos T ou células NK. (Turgeon, 2011)

A **linfocitose**, ou seja, a contagem de linfócitos acima do valor de referência ($4 \times 10^3/\mu\text{L}$) pode estar associada a processos infecciosos agudos ou crônicos, mas também a leucemias. A diminuição da contagem de linfócitos abaixo do limite inferior de referência designa-se por **linfopenia** e entre as causas para esta situação estão: insuficiência grave da medula óssea; tratamentos com imunodepressores; e ainda síndromes de imunodeficiência como o HIV. (Hoffbrand e Moss, 2018)

- **Plaquetas**

A **trombocitose** trata-se do aumento das plaquetas em circulação acima de $400 \times 10^3/\mu\text{L}$ e pode ser provocada por um processo reativo geralmente causado por uma infecção ou por patologias clonais como as neoplasias mieloproliferativas, mais concretamente a trombocitemia essencial. (Rivarola CM *et al.*, 2009)

Quando a contagem plaquetar surge abaixo do ~~valor de~~ limite inferior de referência denomina-se de **trombocitopenia**. Uma das causas mais comum é a falha da produção de plaquetas na medula óssea, que pode ser provocada por várias situações: o uso de determinados fármacos; leucemias; mieloma múltiplo, entre outras. A trombocitopenia tem como consequência a ocorrência de hemorragias. (Hoffbrand e Moss, 2018)

2.5) Patologias hematológicas malignas

Leucemias

São patologias caracterizadas pela acumulação de células malignas na medula óssea e no sangue. A acumulação destas células anormais provoca falência medular que resulta em sintomas como anemia, neutropenia e trombocitopenia. Estas células anormais podem ainda infiltrar-se em órgãos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

A classificação das leucemias separa-as em leucemias crónicas e leucemias agudas e dentro destes grupos ainda se distingue as de linhagem mieloide e as de linhagem linfóide.

As **leucemias agudas** são patologias geralmente agressivas uma vez que a alteração genética ocorre na célula estaminal ou em progenitores primitivos resultando em aumento da taxa de proliferação celular, inibição da apoptose e bloqueios na diferenciação celular. O resultado destes eventos é a acumulação de células hematopoiéticas primitivas denominadas blastos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

As **leucemias crónicas** distinguem-se das agudas por apresentarem uma progressão mais lenta, presença de formas celulares maduras na medula e/ou sangue periférico e contagem leucocitária que varia de elevada a baixa. (Hoffbrand e Moss, 2018)(Turgeon, 2011)

No laboratório de hematologia do IPO, a **leucemia linfocítica crónica (LLC)** é das patologias hematológicas mais frequentes quer em termos de diagnóstico quer de monitorização. A LLC é geralmente caracterizada por leucocitose como consequência da linfocitose provocada pelo aumento do número de linfócitos maduros no sangue.

O esfregaço de sangue periférico apresenta elevada percentagem de linfócitos B pequenos e com pouco citoplasma, característicos desta patologia, bem como sombras nucleares. A figura 3 apresenta um esfregaço de LLC.

Por vezes estes doentes desenvolvem autoimunidade contra células do sistema hematopoiético podendo apresentar anemia hemolítica autoimune. (Hoffbrand e Moss, 2018)

As células de LLC geralmente apresentam diminuição do processo apoptótico, podendo acumular-se no sangue, medula óssea, fígado, baço e nódulos linfáticos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

O diagnóstico pode ser feito por imunofenotipagem, que no caso da LLC confirma a presença de células B (marcador CD19⁺ na superfície) com níveis baixos de imunoglobulinas de superfície e expressão de cadeias clonais (Hoffbrand e Moss, 2018)

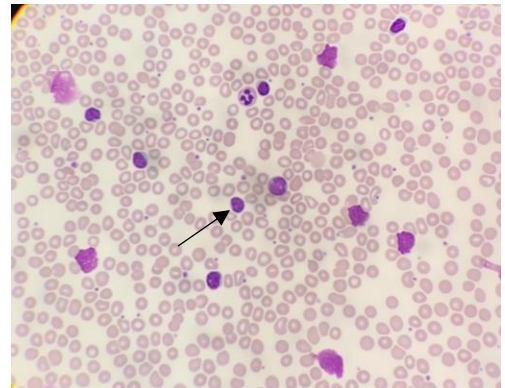


Figura 3: Esfregaço de LLC. Fonte: Setor de Hematologia do IPO de Coimbra.

Patologias mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas são um grupo de patologias caracterizadas pela proliferação descontrolada de um ou mais componentes hematopoiéticos que surge devido a alterações genéticas nas células progenitoras da medula óssea. (Hoffbrand e Moss, 2018)

No laboratório de Hematologia do IPO as mais comuns são a leucemia mieloide crónica (LMC), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP).

A **leucemia mieloide crónica** é caracterizada por uma alteração genética que resulta de translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, originando o cromossoma *Philadelphia* (Ph). Esta alteração origina o gene de fusão *BCR-ABL*- responsável pela produção de uma proteína, a p210, com atividade tirosina cinase desregulada.

Em termos laboratoriais caracteriza-se por uma leucocitose acentuada que pode apresentar valores superiores a $200 \times 10^3/\mu\text{L}$, com proliferação de células da linha mieloide, incluindo formas imaturas. A basofilia também é uma característica e o desenvolvimento de anemia normocítica normocromica é comum nestes pacientes. (Hoffbrand e Moss, 2018)

A deteção do ponto de quebra do gene *BCR-ABL* é realizada no sistema GeneXpertDx através de um ensaio de RT-PCR em tempo real. Para a realização do ensaio utiliza-se uma amostra de sangue que começa por ser tratada com proteinase K, reagente de lise e etanol. Posteriormente a mistura da amostra daí resultante é colocada no cartucho GeneXpert descartável juntamente

com 3 reagentes de preparação da amostra e é inserido no sistema GeneXpertDx. Após 2h, o resultado é transmitido em % e permite quer o diagnóstico quer a monitorização da LMC.

A **trombocitemia essencial** apresenta um aumento acentuado do número de plaquetas em circulação devido à excessiva proliferação megacariocítica e superprodução de plaquetas. No esfregaço de sangue periférico podem observar-se plaquetas grandes e anormais e fragmentos de megacariócitos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Em 50 a 60% dos casos a mutação no gene *JAK2* está presente e afeta a função plaquetar desencadeando um estado pré- trombótico. (Hoffbrand e Moss, 2018)

No caso da **mielofibrose primária**, a característica predominante é a progressão generalizada de um processo fibrótico na medula óssea, associado a desenvolvimento de hematopoiese no fígado e baço. O desenvolvimento de anemia e de esplenomegalia é comum.

Os fibroblastos são estimulados por um fator de crescimento de origem plaquetar e por outras citocinas secretadas quer por plaquetas quer por megacariócitos. A hiperplasia de megacariócitos anormais provoca então a fibrose na medula. (Hoffbrand e Moss, 2018)

A nível das análises laboratoriais, a mielofibrose apresenta contagens de leucócitos e plaquetas quase sempre com valores elevados numa fase precoce da doença enquanto que em estados mais avançados apresenta leucopenia e trombocitopenia. No esfregaço de sangue periférico é comum observar-se glóbulos vermelhos em forma de lágrima (dacriócitos) e leucócitos imaturos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Síndromes mielodisplásicas

As Síndromes mielodisplásicas (SMD) representam um grupo de doenças hematológicas com insuficiência progressiva da medula óssea e que têm em comum alterações genéticas adquiridas nas células progenitoras hematopoiéticas as quais resultam num clone anómalo com alterações de maturação e proliferação, bem como um aumento da apoptose- responsável por hematopoiese ineficaz e pela citopenia de uma ou mais linhagens hematopoiéticas que se verifica no estado inicial destas patologias. Com o avançar da doença a apoptose diminui e a proliferação de células anómalas aumenta.

As SMD têm elevada probabilidade de evoluir para leucemia mieloide aguda devido à instabilidade genética e a novas alterações genéticas que surgem no decorrer da patologia. (Vassallo e Magalhães, 2009)(Hoffbrand e Moss, 2018)

Normalmente as síndromes mielodisplásicas são uma patologia primária, no entanto, em alguns pacientes esta surge como secundária a quimioterapia e/ou a radioterapia sendo nestes casos designada por SMD relacionada à terapia (SMD-t). (Hoffbrand e Moss, 2018)

A classificação das mielodisplasias é feita com base no hemograma, nos aspetos morfológicos observados no esfregaço de sangue periférico e de medula óssea, número de blastos quer no sangue quer na medula e quantidade de linhas celulares com displasia. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Linfomas

Os linfomas caracterizam-se pela acumulação de linfócitos malignos nos nódulos linfáticos dando origem a um quadro clínico característico de linfadenopatias. Pode ocorrer uma fase leucémica em que estes linfócitos circulam no sangue ou se infiltram em órgãos fora do tecido linfoide. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Estas neoplasias são subdivididas em linfoma de Hodgkin (presença histológica de células de Reed-Sternberg) e linfomas não Hodgkin, sendo estes últimos os mais comuns no SPC.

Os **linfomas não Hodgkin** são um grupo de tumores linfoides clonais em que cerca de 85% tem origem em células B e 15% em células T ou NK. Variam de tumores bastante proliferativos até tumores mais indolentes e bem-tolerados. Os tumores indolentes respondem bem à quimioterapia pelo que são denominados de “baixo-grau” enquanto os mais agressivos se denominam de “alto grau” - ainda que sejam potencialmente tratáveis. (Hoffbrand e Moss, 2018).

O diagnóstico definitivo é feito por imunofenotipagem e por observação histológica de biópsia do gânglio linfático.

Durante o período de estágio no sector de Hematologia os linfomas mais comuns foram:

- **Linfoma folicular**: este linfoma tem origem em células B do centro germinativo do folículo linfático e está normalmente associado à translocação t (14;18) que provoca a expressão

aumentada de um gene responsável pela redução da apoptose e sobrevida aumentada das células. Os pacientes apresentam linfadenopatias disseminadas. (Hoffbrand e Moss, 2018)

-Linfoma de zona marginal: tem origem em células B da zona marginal dos folículos germinais. Podem ter origem no baço, nas mucosas ou nos nódulos linfáticos. (Hoffbrand e Moss, 2018)

-Linfoma de células do manto: deriva de células B que não passaram no centro germinativo e que estão localizadas nos folículos primários ou na zona do manto de folículos secundários. Estas células expressam CD5 e geneticamente apresentam, normalmente, a translocação t(11;14) que sobrepõe o gene da cadeia pesada da imunoglobulina ao gene da ciclina D1 resultando na expressão aumentada desta ciclina. (Hoffbrand e Moss, 2018) (Balagué, Colomo e Campo, 2004)

- Síndrome de Sézary: trata-se de um linfoma de células T, CD4 positivas. No esfregaço de sangue periférico observam-se linfócitos com aspeto cerebriforme. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Mieloma Múltiplo

O mieloma múltiplo é uma neoplasia causada pela proliferação desregulada de plasmócitos clonais na medula óssea. Estes plasmócitos sofreram mutações somáticas e são responsáveis pelo aparecimento de uma imunoglobulina monoclonal (paraproteína) no soro. (Hoffbrand e Moss, 2018)

O excesso de cadeias leves (Kappa e Lambda) das imunoglobulinas no soro, que se verifica quase na totalidade dos casos, leva a que estas sejam filtradas no glomérulo e apareçam na urina, uma condição denominada proteinúria de Bence-Jones. (Tomaz *et al.*, 2017)

A determinação destas proteínas é de grande importância para o diagnóstico do Mieloma Múltiplo e é realizada no setor de Imunologia do SPC através da eletroforese de proteínas e de uma reação de imunoprecipitação resultante da adição de antissoros com especificidade para cadeias leves e pesadas. Se as imunoglobulinas monoclonais estiverem presentes verifica-se um pico na zona das γ globulinas e uma redução das globulinas β e γ normais. (Bottini, 2007)

O diagnóstico desta patologia tem em conta a presença de proteína monoclonal no soro e /ou na urina ($\geq 3\text{g/dL}$), o aumento clonal de plasmócitos na medula óssea ($\geq 10\%$) e a presença de dano nos tecidos ou órgãos. Este dano pode ser avaliado pelos critérios CRAB (hipercalcemia, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas). (Hoffbrand e Moss, 2018)

As complicações fisiopatológicas dos estados avançados desta doença são a destruição óssea, a falência renal, redução da hematopoiese e aumento do risco de infeções. (Tomaz *et al.*, 2017)

2.6) Velocidade de sedimentação (VS)

Trata-se de um teste inespecífico, mas que é realizado com frequência e que permite determinar a velocidade a que os eritrócitos presentes na amostra sedimentam. A velocidade de sedimentação é influenciada pela concentração plasmática de fibrinogénio, de imunoglobulinas e de outras proteínas de fase aguda. (Santos, Cunha e Cunha, 2000)

Os eritrócitos normalmente têm carga negativa e repelem-se, mas na presença de proteínas de alta massa molecular, como estas neutralizam as cargas negativas, ocorre agregação e consequente sedimentação. Estas proteínas de alta massa molecular aumentam a viscosidade e promovem a formação de rouleaux que aumenta a velocidade de sedimentação. (Bochen *et al.*, 2011)

2.6.1) Metodologia

O equipamento utilizado para a determinação da velocidade de sedimentação é o ALI FAX® Test I BCL que faz a análise por técnica fotométrica capilar. É determinada a densidade ótica da amostra que está relacionada com a agregação dos eritrócitos. Os valores dessa densidade são convertidos por um modelo matemático de modo a obter resultados em mm/h. Para cada amostra o aparelho faz uma curva de agregação e sedimentação. (Cha *et al.*, 2009)

2.6.2) Alterações associadas a patologias

A VS aumenta em processos inflamatórios, uma vez que há aumento de proteínas de fase aguda. No mieloma múltiplo, como há aumento da concentração de imunoglobulinas a VS está

aumentada e no caso de anemias graves, devido à baixa concentração de eritrócitos também se verificam valores altos de velocidade de sedimentação. (Hoffbrand e Moss, 2018)

2.7) Hemostase

O sangue é mantido em estado fluido no interior dos vasos sanguíneos por um processo fisiológico denominado hemostasia. Este processo é muito importante para que não ocorram hemorragias ou trombozes e depende da interação entre a parede vascular, as plaquetas em circulação e os fatores de coagulação.

Quando há um dano vascular, a resposta hemostática imediata é a vasoconstrição de modo a diminuir o fluxo de sangue na região da lesão e ativar as plaquetas e os fatores de coagulação. Esta adesão das plaquetas ao tecido conectivo exposto é mediada pelo fator de von Willebrand (FvW). Plaquetas em circulação são atraídas para a região lesada promovendo o crescimento do tampão hemostático de modo a cobrir o tecido conectivo exposto. (Hoffbrand e Moss, 2018)(Rezende, 2010)

In vivo, a coagulação ocorre após lesão do vaso que expõe o fator tecidual (TF) que ao entrar em contacto com o fator VII plasmático ativado, dá origem ao complexo fator VIIa-TF que por sua vez ativa o fator X iniciando a cascata de coagulação- que leva à formação de uma pequena quantidade de trombina.

O complexo VIIa-FT é de seguida inativado pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI), mas a pequena quantidade de trombina formada ativa os fatores IX, VIII, V e XIII e cliva o fator VIII do seu transportador, o fator de von-Willebrand. Os fatores IX e VIII ativados, na presença de fosfolípidos e cálcio ativam o fator X que juntamente com o fator V ativado, cálcio e fosfolípidos origina o complexo protrombinase, amplificando a quantidade de trombina formada na fase inicial. Esta trombina, por sua vez vai atuar no fibrinogénio para formar o coágulo de fibrina que é estabilizado pelo fator XIII ativado. (Hoffbrand e Moss, 2018)

In vitro, a coagulação pode ocorrer de duas formas distintas, normalmente designadas de vias, a extrínseca e a intrínseca, que convergem numa via comum. A via extrínseca é ativada pela lesão vascular que expõe o fator tecidual que ao entrar em contacto com o fator VII ativa-o e este

por sua vez ativa o fator X. No caso da via intrínseca o fator XII é ativado quando o sangue entra em contacto com uma superfície diferente do endotélio e das células sanguíneas- ativação por contacto. O fator XII ativado ativa o fator XI que ativa o IX. Por sua vez, o fator IX ativado, e na presença do fator VIII ativado por pequenas quantidades de trombina, ativa o fator X. Com o fator X ativado inicia-se a chamada via comum onde convergem as duas vias anteriores. A ativação do fator X atua na protrombina originando trombina que cliva o fibrinogénio em fibrina. (Hoffbrand e Moss, 2018)

2.7.1) Provas de coagulação sanguínea

2.7.1.1) Metodologia

A amostra de sangue periférico é colhida para tubo com o anticoagulante citrato de sódio (a 3,2 %) numa proporção anticoagulante/amostra fixa de 1:9. Um excesso de anticoagulante pode alterar a diluição esperada e provocar erros no resultado obtido, por esse motivo tem de se colher o volume correto de 3,7 mL. Os tubos vão a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada para que não haja degradação de fatores. Após a centrifugação o plasma é rico em plaquetas e pobre em fosfolípidos para que estes não interfiram nos testes.

O equipamento utilizado para realizar as provas de coagulação sanguínea é o ACL TOP 350 que utiliza a técnica de turbidimetria. A formação do coágulo de fibrina faz com que haja turvação e a intensidade do feixe de luz detetado pelo aparelho baixa. A turbidez da amostra é apresentada num gráfico que relaciona absorvância e comprimento de onda.

2.7.1.2) Parâmetros determinados e alterações patológicas associadas

Tempo de Protrombina

O tempo de protrombina (TP) avalia o fator VII da via extrínseca e os fatores X, V, protrombina (II) e fibrinogénio da via comum. A prova inicia-se com a adição de tromboplastina (fator tecidual), fosfolípidos e íões de cálcio ao plasma do doente. A formação de complexos entre a tromboplastina e o fator VII ativado vai ativar os fatores X, V e protrombina. O tempo

decorrido entre a adição do reagente e a formação do coágulo corresponde ao resultado final. (Ferreira *et al.*, 2010)(Turgeon, 2011)

A tromboplastina utilizada em cada laboratório pode diferir no método como foi obtida o que provoca variações no resultado do teste. Perante isto e de modo a uniformizar os resultados foi estabelecida uma tromboplastina padrão que serve de referência e relativamente à qual as tromboplastinas utilizadas por qualquer laboratório têm de ser aferidas Esta aferição é traduzida num valor numérico designado de Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) e cada fabricante de reagente deve atribuir um ISI a cada lote depois de comparar com a tromboplastina de referência internacional que por definição tem um ISI de 1.0. Para corrigir a variabilidade dos resultados causados pelas diferentes tromboplastinas foi também estabelecido a utilização de uma razão em vez do tempo de protrombina denominada de Razão Internacional Normalizada (RIN) que se obtém da seguinte forma

$$RIN = \left(\frac{TP_{paciente}}{TP_{controle}} \right)^{ISI} . \text{ (Turgeon, 2011)}$$

O tempo de protrombina com valores altos pode indicar um défice num dos fatores avaliados nesta prova, principalmente do fator VII, para o qual este teste tem maior sensibilidade ou para outras patologias como a deficiência de vitamina K (cofator para a síntese dos fatores II, VII, IX, X), hepatopatias ou coagulação vascular disseminada. Outra razão para o TP apresentar valores altos é o tratamento com anticoagulantes orais, nomeadamente a varfarina- inibidor da vitamina K. (Hoffbrand e Moss, 2018)

Tempo de tromboplastina parcial ativada

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) é o teste utilizado para avaliar os fatores VIII, IX, XI e XII da via intrínseca e os fatores X, V, protrombina (II) e fibrinogénio da via comum. A prova inicia-se com a adição de um reagente, que se assemelha a uma superfície de contacto, cálcio e fosfolípidos, ao plasma em análise e termina com a formação do coágulo de fibrina. O tempo decorrido até à formação do coágulo corresponde ao TTPA e é apresentado em segundos. (Hoffbrand e Moss, 2018) (Turgeon, 2011)

Valores altos de TTPA podem indicar deficiência de algum dos fatores referidos acima ou a presença de anticoagulantes em circulação, como o anticoagulante lúpico por exemplo. (Hoffbrand e Moss, 2018)

As patologias mais comuns associadas ao aumento do TTPA por deficiência de fatores são de carácter hereditário e são:

- Hemofilia A: caracteriza-se pela deficiência de fator VIII e em termos de resultados laboratoriais apresenta baixo nível plasmático deste fator ou até ausência do mesmo e valor normal de TP;
- Hemofilia B: neste caso é a deficiência ou ausência de fator IX que causa o aumento do TTPA. Apresenta também um valor de TP normal;
- Doença de von Willebrand: é caracterizada por baixos níveis plasmáticos ou funcionamento anormal do fator de von Willebrand. Este fator é responsável pela adesão de plaquetas ao subendotélio e é o portador do fator VIII, o que explica que portadores de doença de von Willebrand apresentem valores baixos de fator VIII.

Deteção de anticoagulante lúpico

Este anticoagulante pertence à família dos anticorpos anti-fosfolípidos e apesar de não inibir nenhum fator da coagulação causa interferências nas reações de coagulação dependentes de fosfolípidos, principalmente no TTPA. Está associado ao aumento de risco trombótico contrariamente ao que o nome indica. (Turgeon, 2011)

Antes de a amostra ser processada sofre duas centrifugações a 2500g durante 15 minutos para que se obtenha plasma pobre em plaquetas de modo a que os fosfolípidos da membrana destas não causem falsos positivos.

Os anticorpos anti-fosfolípidos avaliados na pesquisa de anticoagulante lúpico (AL) são muito heterogéneos pelo que não existe um teste específico para a sua deteção. São feitos dois testes, o SCT (Silica Clotting Time) e o dRVVT (Tempo de Veneno de Cobra Russel diluído) em que cada um utiliza um reagente de screening pobre em fosfolípidos e um de confirmação rico em fosfolípidos. O reagente de screening é mais sensível ao AL porque tem poucos fosfolípidos. A

razão entre o resultado do screening e do confirmatório é que vai ditar se o teste é ou não positivo para o AL (se for $\geq 1,2$ é positivo). (F. Abreu *et al.*, 2018)

Quantificação do fibrinogénio pelo método de Clauss

Neste teste adiciona-se uma elevada concentração de trombina ao plasma em análise e é medido o tempo de coagulação que é proporcional à concentração de fibrinogénio. O objetivo da adição de trombina em alta concentração é medir a velocidade de reação dependente apenas da concentração de fibrinogénio. A presença de heparina em elevadas concentrações e a presença de produtos de degradação do fibrinogénio interferem com o teste e podem diminuir falsamente os resultados. (Bain *et al.*, 2011)

Tempo de trombina

Este teste permite avaliar o tempo de conversão do fibrinogénio em fibrina, após a adição de trombina. O tempo de trombina (TT) está aumentado quando há deficiência ou anormalidade do fibrinogénio e na presença de heparina por ser um inibidor da trombina. (Hoffbrand e Moss, 2018)

D-dímeros

A trombina, o fator XIII ativado e a plasmina ativam a fibrinólise para que ocorra a degradação da fibrina, da qual resultam D-dímeros. Valores altos (>278) alertam para o risco da formação de trombos, no entanto os D-dímeros também aumentam em situações como gravidez, infeção e cancro o que torna este marcador sensível, mas não específico para a ocorrência de trombose. Isto é, se o valor do teste está abaixo do *cutoff* não há risco trombótico, mas se está acima são necessários outros estudos para confirmar ou não o risco da ocorrência de trombose. (Hoffbrand e Moss, 2018)

O teste para a quantificação de D-dímeros consiste num imunoensaio automatizado em que são adicionadas, ao plasma em análise, partículas de látex revestidas com um anticorpo monoclonal

anti D-dímero. Se não existirem D-dímeros na amostra, as partículas de látex permanecem em suspensão dando origem a altas leituras turbidimétricas. Pelo contrário, se a amostra tiver D-dímeros então as partículas de látex aglutinam e originam valores baixos de leituras turbidimétricas. (Tripodi, 2011)

A quantificação de D-dímeros é muito utilizada para diagnóstico e monitorização de tromboembolia venosa e coagulação intravascular disseminada. (Tripodi, 2011)

Inibidores fisiológicos dos fatores da coagulação

Para além do processo de fibrinólise, o sangue possui anticoagulantes naturais que limitam a formação do coágulo de modo a que não ocorra oclusão dos vasos sanguíneos (trombose). Os principais inibidores sanguíneos da coagulação são:

-antitrombina III: inibe a trombina e o fator X ativado e a sua ação é potenciada pela heparina;

-proteína C: é uma serina protease dependente de vitamina K e tem a capacidade de degradar os fatores V e VIII ativados evitando assim a formação de mais trombina;

-proteína S: também é dependente de vitamina K e é cofator da proteína C promovendo a sua ligação à superfície das plaquetas. (Hoffbrand e Moss, 2018)

2.8) Imunofenotipagem

A imunofenotipagem é uma ferramenta essencial no diagnóstico e monitorização de determinadas patologias hematológicas. No IPO de Coimbra, recorre-se frequentemente a esta técnica como meio auxiliar de diagnóstico de leucemias e linfomas, principalmente. No entanto, durante o período de estágio apenas tive uma oportunidade de contactar com este tipo de técnica, pelo que vou apenas descrever brevemente a sua metodologia.

2.8.1) Metodologia

O autoanalisador utilizado é o FC 500 Cytomics Beckman Coulter® que faz análise por citometria de fluxo.

Através da imunofenotipagem é possível identificar antígenos celulares, nucleares e plasmáticos. São utilizados anticorpos monoclonais marcados com sondas/ fluorocromos, que produzem fluorescência quando excitados por um feixe de luz, e que são adicionados à suspensão de células de interesse. Quando as células marcadas com os anticorpos e os fluorocromos passam pelo laser do citômetro há uma absorção de luz pelos fluorocromos que depois emitem um comprimento de onda maior que o recebido- fluorescência. Os comprimentos de onda de emissão dos diferentes fluorocromos permitem a emissão de cores diferentes e assim a determinação de várias propriedades celulares. (Martins e Gagliani, 2009)

A escolha dos anticorpos e dos fluorocromos a usar é feita com base na hipótese de diagnóstico proposto pelo clínico e pelas informações relevantes no hemograma. As amostras utilizadas podem ser sangue, medula óssea ou biópsia de nódulos linfáticos. (Martins e Gagliani, 2009)

3. Setor de Microbiologia

Os microrganismos interagem de forma complexa com o hospedeiro humano podendo daí resultar uma doença. A Microbiologia é a ciência que se ocupa do estudo destes organismos microscópicos. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009)

Num hospital oncológico, onde os pacientes estão maioritariamente imunodeprimidos, a probabilidade de contraírem infeções é elevada, pelo que o Setor de Microbiologia é de extrema importância para a identificação do microrganismo que causou a infeção assim como para a identificação do(s) antibiótico(s), de entre os disponíveis, a que o microrganismo é suscetível, de modo a haver uma rápida e eficaz recuperação do doente.

Durante o período de estágio no Setor de Microbiologia, não tive a oportunidade de analisar amostras com-vírus ou parasitas, pelo que não serão abordados neste relatório.

As bactérias são seres procariotas microscópicos que podem ser classificados de acordo com as características macroscópicas das colónias obtidas nos meios sólidos (forma, cor, tamanho, cheiro) e de acordo com as características microscópicas (forma, cor, tamanho). (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009)

Em relação às características microscópicas, as bactérias podem apresentar diversas morfologias, como bacilos, cocos, cocobacilos, espiroquetas, entre outras. A morfologia é possível de observar microscopicamente após coloração de Gram, uma técnica diferencial que permite fazer a distinção entre bactérias Gram positivo e Gram negativo direcionando quase de imediato para o tipo de processamento que se deve realizar de seguida, bem como o tipo de antibióticos a testar. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009)

Após a execução da técnica de Gram (descrita em anexo), as bactérias que possuem parede constituída por uma camada espessa de peptidoglicano coram de roxo, pois o corante cristal violeta fica retido nessa camada, e são designadas de Gram positivo. Já as bactérias que possuem uma fina camada de peptidoglicano sofrem a ação do descorante e depois adquirem a coloração rosa avermelhado da safranina, sendo designadas de Gram negativo. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009)

Existem ainda bactérias, como as micobactérias, com parede ácido-álcool-resistente e que só são visíveis microscopicamente através de uma coloração específica pela técnica de Kinyoun (descrita em anexo).

Os fungos são seres eucariotas que podem apresentar-se sob a forma de levedura (unicelular), hifas (pluricelular) ou ambas (fungos dimórficos). Apresentam crescimento lento, necessitam de uma atmosfera húmida e de temperaturas indicadas para o tipo de fungo de que se suspeita. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009)

Tanto hifas como leveduras são visíveis no esfregaço do produto depois de corado pela coloração de Gram, aparecendo coradas de roxo.

No estágio tive oportunidade de contactar com várias amostras, nomeadamente:

- Urina;
- Sangue;
- Exsudatos purulentos;
- Ponta do cateter;
- Amostras respiratórias: expetoração, lavado e aspirado brônquico, lavado broncoalveolar;
- Punção ganglionar.

O Setor de Microbiologia é o menos automatizado dentro do SPC do IPO de Coimbra. Os principais equipamentos que fazem parte deste Setor estão indicados na tabela 4.

Tabela 4: Principais equipamentos utilizados no Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra e respetiva função.

Equipamento	Função
Estufas (25°C,30°C,37°C e 37°C com CO ₂)	Incubação da amostra nas temperaturas adequadas ao desenvolvimento de microrganismos quando presentes
Frigoríficos	Armazenamento de amostras, meios de cultura, meios de identificação e reagentes
Câmara de fluxo laminar	Obtenção de um ambiente estéril para manipular amostras e material esterilizado

Cobas® u41 I (Roche Diagnostics)	Equipamento semiautomático para determinar parâmetros bioquímicos na urina (análise sumária)
Vitek® 2 (BioMérieux)	Equipamento automático para realização de testes de identificação (ID) e testes de suscetibilidade a antibióticos (TSA)
BD Bactec™ 9050 Blood Culture System	Equipamento automático para incubação de hemoculturas e deteção de crescimento de microrganismos nas mesmas
GeneXpert® (Cepheid)	Sistema automático de análise Molecular através de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

c

Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

3.1) Processamento das amostras em geral

As amostras chegam ao Setor acompanhadas da respetiva requisição. Depois de se verificar se a amostra foi colhida e transportada nas devidas condições e se é viável para seguir o processamento é registada e depois é analisada. A maioria das amostras é tratada de forma idêntica e de acordo com o protocolo seguinte:

- 1) realização de esfregaço e coloração de Gram (exame direto do produto);
- 2) sementeira em meios sólidos pela técnica de estriamento (descrita em anexo) e sementeira em meios líquidos enriquecidos caso se trate de amostras líquidas ou haja suspeita de microrganismos fastidiosos;
- 3) incubação e observação passadas 24h. Se após 24h (máximo 48h se assim se justificar) os meios não apresentarem crescimento de colónias e não tiver sido observada flora microbiana no exame direto o resultado é dado como negativo; se apresentarem crescimento de microrganismos que sejam de valorizar então prossegue-se para isolamento do mesmo repicando para uma nova gelose;
- 4) Identificação do microrganismo e teste de suscetibilidade aos antibióticos.

No caso das amostras para pesquisa de micobactérias o processamento é diferente pois inicia-se pela homogeneização da amostra, caso se trate de amostras não estéreis, que consiste em

fazer a descontaminação, fluidificação e concentração da amostra. Posteriormente é feito um exame direto corado pela técnica de Kinyoun.

3.1.1) Exame bacteriológico

O exame bacteriológico realiza-se em todas as amostras que chegam ao setor. A forma como são processadas e a respetiva interpretação dos resultados obtidos é descrita abaixo.

3.1.1.1) Urina

A urocultura é uma técnica quantitativa e é dos procedimentos mais comuns. Tem como objetivo diagnosticar infeções do trato urinário.

As infeções do trato urinário (ITU) são comuns em pacientes hospitalizados, principalmente se forem portadores de algalias, tubos de nefrostomia, cálculos urinários, entre outros fatores que contribuem para a entrada de microrganismos. Dos agentes etiológicos mais associados a estas infeções, a *Escherichia coli* é dos mais frequentes, no entanto em termos hospitalares também *Klebsiella sp*, *Proteus sp*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter sp* e fungos como *Cândida sp* são bastante frequentes. (Lopes e Tavares, 2005)

A colheita de urina pode ser feita de várias formas: colheita do jato intermédio da primeira urina da manhã, punção supra-púbica, punção de cateter urinário ou drenagem de nefrostomia/ ureterostomia.

a) Processamento

A amostra de urina é semeada, pela técnica semiquantitativa, com uma ansa calibrada de 10 µL em dois meios: CLED (cistina-lactose- deficiente em eletrólitos) e CNA (gelose com sangue, colistina e ácido nalidíxico). O CLED é um meio não seletivo, mas diferencial, uma vez que permite diferenciar as bactérias fermentadoras da lactose (alteram a cor do meio para amarelo) das bactérias não fermentadoras da lactose (mantém o meio esverdeado e é utilizado para isolar microrganismos da urina. A deficiência em eletrólitos inibe o “swarming” do *Proteus sp*. O CNA é um meio de isolamento seletivo que permite o crescimento de bactérias Gram positivo e inibe o crescimento de bactérias Gram negativo, nomeadamente *Enterobacter sp* e *Pseudomonas sp*,

devido à adição de colistina e ácido nalidíxico. O sangue presente na gelose permite observar hemólise. (Fonseca *et al.*, 2004)

Depois de semeadas as placas incubam a 37°C e são observadas no dia seguinte, após pelo menos 18h de incubação.

b) Interpretação dos resultados

A amostra de urina é considerada positiva se apresentar um crescimento $\geq 10^5$ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL por placa e a contagem é feita em CLED. Se a placa apresentar duas ou três colónias diferentes valoriza-se o microrganismo mais abundante, isto é, o microrganismo que tiver contagem para considerar a amostra positiva. Se apresentar crescimento de mais de três colónias diferentes o resultado é dado como polimicrobiano. Nos casos em que a contagem de colónias é $< 10^5$ UFC/mL o resultado é dado como negativo, a menos que não tenham entre 18-24h de incubação ou quando se trata de controlo pós-terapêutica para o microrganismo em questão. A figura 4 representa uma amostra considerada positiva e outra negativa.

As amostras consideradas positivas seguem para os passos seguintes: isolamento do microrganismo, identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos.

A análise sumária de urina também faz parte do processamento deste tipo de amostra e é sempre realizada juntamente com o pedido de exame bacteriológico. É uma análise rápida que fornece informações sobre bacteriúria, hematúria, proteinúria, entre outros.

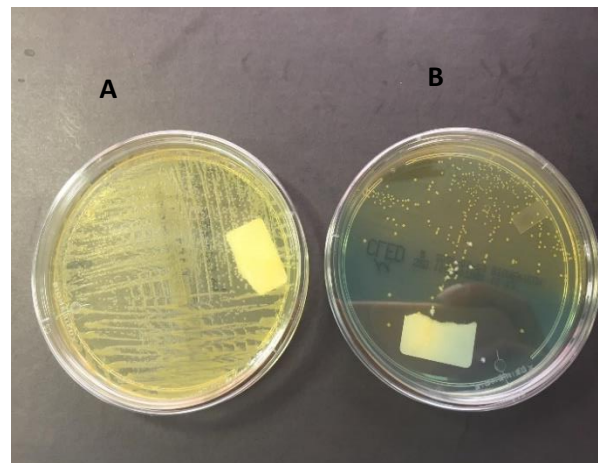


Figura 4: A) Meio CLED com crescimento $\geq 10^5$ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL- positivo. B) Meio CLED com crescimento $< 10^5$ UFC/mL- negativo. Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

Inicia-se com a observação da cor da urina. De seguida são transferidos 10 mL da amostra para um tubo onde se mergulham as tiras de teste Combur¹⁰ Test M que são depois analisadas automaticamente no equipamento Cobas[®] u411. Estas tiras permitem obter, com base na cor adquirida pelos campos correspondentes às várias reações químicas, informações sobre os seguintes parâmetros: densidade, pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glicose, corpos cetónicos,

urobilinógeno, bilirrubina e glóbulos vermelhos. Os 10 mL de amostra são depois centrifugados a 1500 r.p.m durante 5 minutos e após se descartar o sobrenadante é então colocada uma gota de sedimento entre lâmina e lamela para ser observado ao microscópio na objetiva de 40x e com o condensador para baixo.

A tabela 5 mostra alguns dos parâmetros a ter em conta na observação do sedimento e os critérios para expressar a sua presença.

Tabela 5: Critérios para a expressão dos resultados de alguns constituintes do sedimento urinário.

Eritrócitos	Leucócitos	Cilindros	Cilindros	Cristais	Cristais	Células epiteliais
<3 C	<3 C	Muitos	Hialinos	Muitos	Ácido úrico	Muitas
5-10 C	3-6 C	Abundantes	Granulosos	Abundantes	Oxalato de cálcio	Abundantes
10-20 C	6-10 C	Alguns	Hemáticos	Alguns	Fosfato triplo	Algumas
20-30 C	10-20 C	Raros	Leucocitários	Raros	Cistina	Raras
>30 C	>20 C	-	-	-	-	-

Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

Nota: Durante o período de estágio após a interrupção devido ao COVID-19, a análise das tiras de teste Combur10 Test M passou a ser feita manualmente, na câmara de fluxo laminar, seguindo as indicações na embalagem das mesmas.

3.1.1.2) Sangue

O sangue é um fluido estéril, pelo que a presença de um microrganismo nas hemoculturas é um indicador altamente específico de bacteriemia, situação que pode conduzir a infeção da corrente sanguínea (ICS). (Elmor de Araujo, 2012)

A punção venosa para obtenção de sangue para hemoculturas deve ser feita em dois locais anatómicos diferentes e devidamente desinfetados de modo a não haver inoculação de agentes contaminantes da pele. Para cada paciente devem ser feitas duas colheitas, pois assim torna-se mais provável a deteção de baixos níveis de bacteriemia, e caso ocorra contaminação por

microrganismos da pele por norma apenas uma das hemoculturas irá apresentar-se positiva, ou seja, a colheita de duas punções aumenta a sensibilidade do resultado das hemoculturas. Pelo mesmo motivo as punções devem ser realizadas em locais anatómicos diferentes. (Elmor de Araujo, 2012)

Sempre que se suspeita do foco provável da infeção da corrente sanguínea deve-se recolher também material representativo de outros locais, como urina, secreções abcessos, etc. Deste modo, se o microrganismo presente nestas amostras for o mesmo da hemocultura, é possível deduzir a causa da infeção. (Elmor de Araujo, 2012)

O volume de sangue colhido para hemocultura deve ser de 8 a 10 mL e é de extrema importância que seja respeitado, pois quanto maior o volume de sangue inoculado maior a probabilidade de deteção da infeção sanguínea. No entanto há que ter em conta as condições do paciente, principalmente num hospital oncológico em que a maioria das colheitas são difíceis.

As infeções da corrente sanguínea podem também ter fungos como agente etiológico.

As garrafas para hemocultura contêm meio líquido tripticase de soja, um anticoagulante e esferas de resina quelantes de antibiótico, pelo que é possível detetar a bacteriemia mesmo se o doente já tiver iniciado a antibioterapia. Este meio de cultura permite o crescimento de bactérias aeróbias estritas e facultativas e de fungos.

Também existem garrafas para pesquisa de microrganismos anaeróbios, mas apenas são inoculadas se solicitado pelo clínico. Estas garrafas não têm as esferas de resina quelante de antibiótico e têm um meio enriquecido de modo a facilitar o crescimento de microrganismos anaeróbios, fastidiosos e intracelulares.

a) Processamento

O sistema para incubação e deteção de crescimento bacteriano das hemoculturas é o BACTEC 9050. Este equipamento mantém as amostras a 35°C em permanente agitação e deteta o crescimento bacteriano por alterações na fluorescência. No fundo das garrafas de hemocultura existe uma membrana permeável ao CO₂. Se existir crescimento bacteriano há produção deste gás que difunde através da membrana e se dissolve no líquido da garrafa, diminuindo o seu pH.

Esta alteração de pH aumenta a fluorescência que é detetada pelo sistema. (Guareze e Bordignon, 2016)

As hemoculturas incubam 7 dias para deteção de crescimento bacteriano e 14 dias para deteção de crescimento de fungos. Se, após o período de tempo definido, não for detetado crescimento, as amostras são consideradas negativas.

Quando o equipamento indica uma hemocultura para aeróbios como positiva esta é repicada para uma gelose Columbia (COS) que posteriormente incuba a 37°C durante 24 a 48h e é feito um esfregaço para observação ao microscópio depois de corado pela técnica de coloração de Gram.

No caso de hemoculturas positivas para pesquisa de anaeróbios, a repicagem é feita para meio COS e SCS (agar Schaedler com 5% de sangue). O meio SCS é seletivo para microrganismos anaeróbios, como tal incuba numa atmosfera específica que é possível de obter utilizando o sistema GENbag, que consiste numa bolsa plástica onde estão presentes um gerador de atmosfera anaeróbia e um indicador para controlo da mesma. Ambos os meios incubam a 37°C, embora o meio SCS incube durante 5 dias, enquanto o meio COS incuba 24 a 48h.

A repicagem para meio COS, neste caso, tem apenas o objetivo de servir de controlo e de avaliar se o microrganismo é anaeróbio estrito- se for não cresce em meio COS pois é um meio para aeróbios. (Fonseca *et al.*, 2004)

b) Interpretação dos resultados

As geloses para as quais as hemoculturas são repicadas são observadas após terminar o período de incubação e se apresentarem crescimento de colónias, segue-se a identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Nos casos em que na observação do esfregaço ao microscópio, corado pela técnica de Gram, se verifica a presença de microrganismos, mas após o período de incubação da gelose COS esta não apresenta desenvolvimento de colónias, faz-se repicagem da hemocultura para PVX (gelose chocolate com PolyViteX) e incuba novamente a 37°C durante 24 a 48h. O sangue que constitui a gelose PVX é um sangue que foi aquecido de modo a lizar os eritrócitos para que estes libertassem o fator X (Hemina) e o fator V (NAD), essenciais ao crescimento de

microrganismos fastidiosos como o *Haemophilus* spp. e *Neisseria* spp, pelo que a gelose PVX é considerada um meio rico para microrganismos fastidiosos. (Fonseca et al., 2004)

Por vezes o equipamento indica uma hemocultura como positiva, mas quando se visualiza o esfregaço não se observa nenhum microrganismo. Nestes casos, e se após o período de incubação dos meios repicados não houver crescimento de colónias, é considerado como um falso positivo. Um dos motivos para tal acontecer é o paciente possuir um número elevado de glóbulos brancos, o que faz com que haja um elevado metabolismo e consequentemente um aumento na produção de CO₂ que por sua vez aumenta a fluorescência detetada pelo equipamento. Pelo mesmo motivo, o excesso de volume de sangue inoculado também pode conduzir a falsos positivos.

3.1.1.3) Exsudatos purulentos

Muitas são as situações clínicas, bem como os agentes etiológicos, responsáveis por infeções que originam exsudatos purulentos. Alguns dos agentes etiológicos mais associados a este tipo de infeções são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (muito associado a feridas de cateter), *Streptococcus pyogenes* (Grupo A), *Streptococcus* spp. β-hemolítico, *Corynebacterium jeikeium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. (Fonseca et al., 2004)

A metodologia para colheita e transporte dos exsudatos é diferente conforme se trate de lesões abertas ou de lesões fechadas. No caso das lesões abertas a colheita pode ser realizada com zaragatoa que é posteriormente colocada em meio de Stuart ou Amies, um meio de transporte que preserva os microrganismos da amostra. Já no caso das lesões fechadas o exsudato deve ser colhido por punção com seringa. Tendo em conta que nas lesões fechadas podem estar presentes microrganismos anaeróbios, se o clínico pretender a pesquisa dos mesmos, o envio da amostra deve ser feito na própria seringa da colheita devidamente fechada, ou então em contentores fechados esterilizados e sem ar pois só assim é possível recuperar estes microrganismos. Os frascos PORTAGERM™ são indicados para o transporte de amostras líquidas com suspeita de anaeróbios, pois possuem um meio semi-sólido, pré-reduzido e

esterilizado, com uma atmosfera sem oxigénio e um indicador de oxidação redução que permite que o meio altere a cor quando em contacto com oxigénio. (Fonseca *et al.*, 2004)

a) Processamento

As amostras são semeadas, pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido, em gelose COS e PVX, e incubam a 37°C durante 18 a 24h. Paralelamente são feitos esfregaços para corar pela técnica de Gram.

Caso a amostra seja para pesquisa de anaeróbios e tenha sido colhida e transportada em condições para tal, é semeada em duas placas de gelose SCS, sendo que uma incuba em condições de anaerobiose no sistema GENbag e outra em aerobiose durante 48h a 37°C. Neste caso inocula-se ainda um meio líquido para recuperação de anaeróbios, o caldo de Schaedler enriquecido com vitamina K3 (KCS). Também se fazem esfregaços para corar pela técnica de Gram.

Após terminado o período de incubação, as placas são observadas e valorizadas. A turvação do caldo de Schaedler indica que há crescimento bacteriano e por isso é repicado para uma gelose SCS que incuba em anaerobiose e para um meio COS que incuba em aerobiose. Faz-se ainda um esfregaço deste mesmo caldo para observação depois de corado (coloração de Gram).

b) Interpretação dos resultados

A inoculação das amostras para pesquisa de anaeróbios em condições aeróbias é uma forma de controlo para verificar se os microrganismos presentes são verdadeiros anaeróbios.

A zona de proveniência do exsudato deve ser transmitida ao laboratório, uma vez que a interpretação dos resultados depende da localização da ferida e da microbiota associada.

Um crescimento de microrganismos suspeito nas placas e uma observação microscópica suspeita deve ser confirmado com teste de identificação (ID) e teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) após isolamento dos mesmos.

3.1.1.4) Ponta do cateter

Os cateteres intravasculares são bastante utilizados e de fundamental importância para pacientes internados que necessitam frequentemente de procedimentos hospitalares adicionais, tais como administração de soluções, fármacos, sangue, hemodiálise, entre outros. A utilização prolongada

destes dispositivos invasivos representa uma fonte potencial de infecções, quer localizadas, quer sistêmicas. (Marques, Carneiro e Ferreira, 2011)

Os agentes etiológicos mais comuns nas infecções provocadas por cateter são as bactérias e os fungos. Dentro destes grupos os microrganismos mais frequentes são *Staphylococcus* spp, bacilos Gram negativo, *Enterococcus* e *Candida* sp.(Marques, Carneiro e Ferreira, 2011)

O cateter para exames microbiológicos deve ser removido em condições de assepsia, ou seja, após desinfecção da área circundante. Depois de retirado cortam-se 5 cm da parte que estava mais profundamente introduzida na pele e é enviado ao laboratório em contentor estéril seco e sem meio de cultura.

a) Processamento

O processamento do cateter é feito pela técnica de Maki. Esta técnica semiquantitativa consiste em rodar o cateter na superfície da gelose COS de modo a inocular os microrganismos presentes no exterior deste. De seguida coloca-se o cateter em meio líquido BHI (Brain-Heart-Infusion), um meio de enriquecimento para aeróbios, para promover o crescimento dos microrganismos do interior do dispositivo. A inoculação do cateter nos dois meios também permite fazer a distinção entre colonização e infecção do cateter. Os meios incubam 18-24h a 37°C. (Fonseca *et al.*, 2004) (Maki, Weise e Serafin, 1977)

Na figura 5 é possível observar os dois meios utilizados para o exame bacteriológico do cateter.

b) Interpretação dos resultados

Terminado o tempo de incubação os meios são observados e analisados.

Segundo os critérios de Maki, as culturas de cateter são consideradas positivas (infecção) se apresentarem crescimento ≥ 15 UFC. Caso o crescimento seja < 15 UFC então é considerado como colonização do cateter. (Marques, Carneiro e Ferreira, 2011)

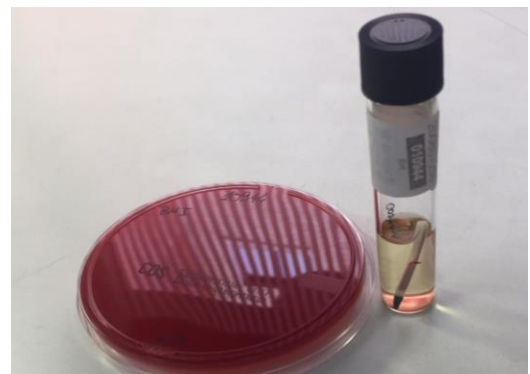


Figura 5: Meio líquido BHI e placa de gelose COS, ambos utilizados na realização do exame bacteriológico de cateter. Fonte: Setor microbiologia do IPO de Coimbra.

Em relação ao caldo BHI, este é repicado para meio sólido.

As culturas positivas seguem para teste identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos.

O objetivo de utilizar a gelose COS e o caldo BHI é poder comparar se os microrganismos presentes no exterior do cateter são os mesmos do interior e averiguar se são a causa de infecção sistémica.

3.1.1.5) Amostras do trato respiratório

O aparelho respiratório é colonizado por microrganismos não patogénicos que formam um microbioma fisiológico com elevada diversidade, mas baixa densidade de colónias. Quando surgem determinados estados patológicos há perda dessa diversidade, e aumento de organismos de dado género em detrimento de outros. (Costa *et al.*, 2018)

No trato respiratório inferior de indivíduos saudáveis, os géneros que predominam são *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria* e *Veillonella*. (Costa *et al.*, 2018)

Já nos casos associados a infeções os agentes patogénicos mais comuns são: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella* spp, *Klebsiella pneumoniae* e *Mycobacterium* spp. (Sader *et al.*, 2001)

No Setor de Microbiologia do IPOFG as amostras mais comuns pertencem ao trato respiratório inferior e são: expetorações, lavados/aspirados brônquicos e lavados broncoalveolares.

As amostras respiratórias são colhidas de acordo com o tipo de amostra. Se se tratar de uma expetoração, esta deve ser obtida instruindo o doente a tossir profundamente (rejeitar amostras de saliva ou rinorreia) e é enviada ao laboratório em recipiente estéril, de boca larga e tampa. Já as amostras de lavados/aspirados brônquicos e lavados broncoalveolares são colhidas por broncoscopia e são enviadas ao laboratório em recipientes estéreis e com tampa. (Fonseca *et al.*, 2004)

a) Processamento

As amostras são semeadas em meio COS e meio PVX pela técnica de estriamento e incubam a 37°C em atmosfera de CO₂ durante 18-24h. No caso dos lavados/aspirados brônquicos e dos lavados broncoalveolares a amostra é também inoculada nos meios líquidos de enriquecimento, BHI e KCS.

Fazem-se também esfregaços para coloração de Gram e observação ao microscópio.

b) Interpretação dos resultados

Em relação à expetoração, a observação da lâmina permite fazer uma avaliação da qualidade da amostra, ou seja, permite avaliar se o produto se trata de verdadeira expetoração ou de saliva. Tal avaliação é efetuada com base na contagem, com a objetiva 10x, do número de leucócitos e células epiteliais por campo. Essa contagem é depois interpretada de acordo com os critérios de Murray & Washington, apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Critérios utilizados para classificar a amostra de expetoração.

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

Fonte: (Fonseca et al., 2004)

As amostras consideradas de qualidade para a realização do exame bacteriológico são as que apresentam uma contagem de células epiteliais inferior a 25, ou seja, as amostras dos grupos 4 e 5. Os restantes grupos representam amostras contaminadas com saliva ou outras secreções da orofaringe, pelo que são inadequadas. (Fonseca et al., 2004)

Quando terminada a incubação as geloses são avaliadas e, se apresentarem crescimento de microrganismos a valorizar, estes são isolados para nova gelose de modo a obter uma cultura pura e proceder para identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos.

A figura 6 apresenta um esfregaço de expetoração com *Streptococcus* sp. e bacilos Gram negativo.

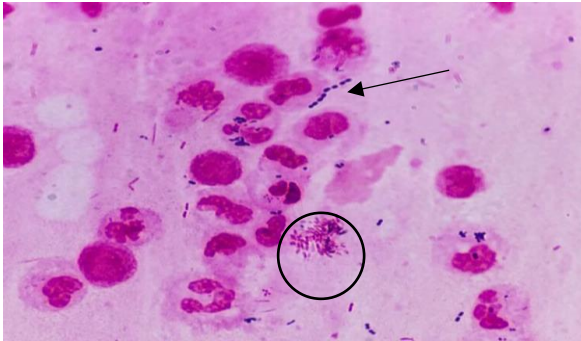


Figura 6: Esfregaço de expetoração corado pela técnica de Gram e com presença de *Streptococcus* sp (indicados pela seta) e bacilos Gram negativo (indicados pelo círculo). Fonte: Setor de microbiologia do IPO de Coimbra.

3.1.1.6) Punção ganglionar

A punção realiza-se com uma agulha fina que perfura o nódulo e recolhe produtos do interior do gânglio. A amostra é enviada ao laboratório em contentor estéril de boca larga e com tampa. Geralmente a quantidade de amostra enviada ao laboratório é pequena pelo que o seu processamento deve ter em conta o (s) exame (s) prioritários. Deste modo, a ordem de prioridade estabelecida no setor é:

- 1º Análise molecular para deteção de micobactérias;
- 2º Pesquisa de micobactérias e teste de suscetibilidade aos antibióticos;
- 3º Exame bacteriológico e micológico.

a) Processamento

Relativamente ao exame bacteriológico, quando é possível a realização deste, semeia-se a amostra em meio COS, PVX e BHI, ou apenas meio PVX e BHI se a quantidade de amostra não for suficiente para os três meios. Os meios incubam 18-24h a 37°C.

b) Interpretação dos resultados

Se após o tempo de incubação as geloses apresentarem crescimento de colónias e/ou o meio líquido estiver turvo significa que a pesquisa de bactérias é positiva e como tal prossegue-se com a identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos do microrganismo isolado.

3.1.2) Exame micológico

O exame micológico faz-se sempre em amostras do trato respiratório (expectoração, lavados e aspirados brônquicos, lavados broncoalveolares) e no líquido pleural. O processamento e a interpretação dos resultados é descrito abaixo.

O meio utilizado para semear as amostras que solicitam pesquisa de fungos e/ou leveduras é a gelose Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina (SGC2). O cloranfenicol é um antibiótico que inibe a síntese proteica nos procariontes, tendo atividade em bactérias Gram negativas e Gram positivas. A gentamicina é um antibiótico que pertence ao grupo dos aminoglicosídeos e também impede a síntese de proteínas bacterianas, atuando especialmente em Gram negativo. A adição dos antibióticos referidos faz do meio SGC2 um meio seletivo para isolamento de fungos. (Guimarães, Momesso e Pupo, 2010)

a) Processamento

Semeiam-se duas geloses de SGC2, uma para incubação a 30°C e outra para 37°C, sendo esta última para pesquisa de fungos filamentosos.

A sementeira na gelose SGC2 é feita pela técnica de estriamento, com exceção dos casos em que se pretende especificamente pesquisar fungos filamentosos, em que a sementeira é feita pela técnica de picada (descrita em anexo) ou no caso das pontas de cateter, que são semeadas pelo método de Maki.

O tempo de incubação depende do tipo de fungo: se a pesquisa for para leveduras, incuba no mínimo 24h; se for para fungos filamentosos incuba no mínimo um mês. Nestes últimos, a placa é revestida com parafilm[®] de modo a que não haja contaminação das restantes amostras que se encontram na estufa.

Em relação aos restantes tipos de amostras que chegam ao setor, a pesquisa de fungos só se realiza se o clínico pedir, se forem observadas leveduras ou hifas nos respetivos esfregaços ou se houver histórico de infeção por fungos. Para estas amostras inocula-se apenas uma gelose SGC2 que incuba a 37°C.

b) Interpretação dos resultados

No que diz respeito às leveduras, o género *Candida* é apontado como um dos maiores agentes de infeção hospitalar. Esta levedura, que normalmente coloniza o homem, perante uma alteração no sistema imunológico do hospedeiro pode causar diversas infeções, localizadas ou disseminadas. A espécie *Candida krusei* é das que apresenta maior relevância do ponto de vista de identificação, uma vez que possui resistência intrínseca ao Fluconazol, um antifúngico de primeira linha. (Júnior *et al.*, 2011)(Vieira e Santos, 2017)

Na presença de crescimento de leveduras na gelose SGC2, estas são repicadas para uma gelose COS para se proceder a identificação e teste de suscetibilidade aos antibióticos.

Relativamente aos fungos filamentosos, durante o meu período de estágio neste setor não se proporcionou a observação do método de identificação deste tipo de microrganismos pelo que não irei descrevê-lo.

3.1.3) Exame micobacteriológico

As micobactérias possuem uma parede diferente das restantes bactérias pelo que não coram pela coloração de Gram. A sua parede é constituída por um alto teor de lípidos, principalmente ácidos micólicos que são os responsáveis por conferir a resistência à descoloração pelo álcool-ácido. Para corar estas bactérias ácido-álcool- resistentes recorre-se ao método de Kinyoun (descrito em anexo).

Pertencem ao género *Mycobacterium* e são bacilos finos, retos ou ligeiramente curvos, aeróbios ou microaerófilos, geralmente de crescimento lento e que coram de vermelho pelo método referido. (Wildner *et al.*, 2011)

a) Processamento

Das amostras que chegam ao Setor de Microbiologia, as amostras respiratórias e as punções ganglionares são as que mais frequentemente requerem exame micobacteriológico. O processamento das amostras para pesquisa de bacilos ácido- álcool-resistentes (BAAR) inicia-se com a técnica da homogeneização (descontaminação, fluidificação e concentração da amostra). Depois de tratadas, as amostras são inoculadas em dois meios: Löwestein-Jensen (LJ)- meio sólido enriquecido para micobactérias, mas não seletivo; MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) - meio líquido ao qual é adicionada uma solução de antibióticos que torna o meio

seletivo. Fazem-se também esfregaços para coloração pela técnica de Kinyoun para observação microscópica. Os meios incubam a 37°C durante 6 semanas, mas são avaliados semanalmente. (Fonseca *et al.*, 2004)

b) Interpretação dos resultados

Os esfregaços são interpretados de acordo com a tabela 7.

Tabela 7: Interpretação de esfregaços para pesquisa de bacilos-ácido-álcool-resistentes.

Número de bacilos ácido-álcool resistentes observados	Interpretação
0	Negativo
1 a 2 /300 campos	Duvidoso (confirmar)
1 a 9 /100 campos	1+
1 a 9 /10 campos	2+
1 a 9 / 1 campo	3+
>9 / 1 campo	4+

Fonte: Setor microbiologia do IPO de Coimbra.

A positividade do meio LJ baseia-se no crescimento de colónias esbranquiçadas com forma de “couve-flor” enquanto a positividade do MGIT é detetada pela leitura de fluorescência. (ANVISA, 2010)

Quando o meio de LJ apresenta colónias de micobactérias procede-se à sua identificação por análise Molecular, pela técnica de PCR em tempo real. O kit utilizado apenas permite identificar *Mycobacterium tuberculosis*. A amostra é enviada para o Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC) para identificação (nos casos em que não se trata de *M. tuberculosis*) e TSA. No setor não se fazem identificações a partir do MGIT, nestes casos quando há positividade neste meio a amostra é imediatamente enviada para o CHUC.

3.2) Identificação de microrganismos e Testes de suscetibilidade a antibióticos

Nas culturas validadas como positivas é necessário proceder à identificação (ID) do microrganismo responsável pela infeção, bem como ao teste de suscetibilidade aos antibióticos

(TSA), de modo a direcionar o clínico para a antibioterapia mais adequada e eficaz. No Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra, os testes de identificação definitiva e o TSA são realizados no sistema automatizado Vitek® 2. No entanto, pela observação das colónias e pela realização de determinadas provas bioquímicas é possível fazer uma identificação preliminar presuntiva do microrganismo, orientando assim também para a carta de identificação e o TSA mais indicado a realizar.

As identificações e o TSA realizam-se a partir de culturas puras.

Na figura 7 está representado o esquema utilizado no laboratório para a identificação dos microrganismos.

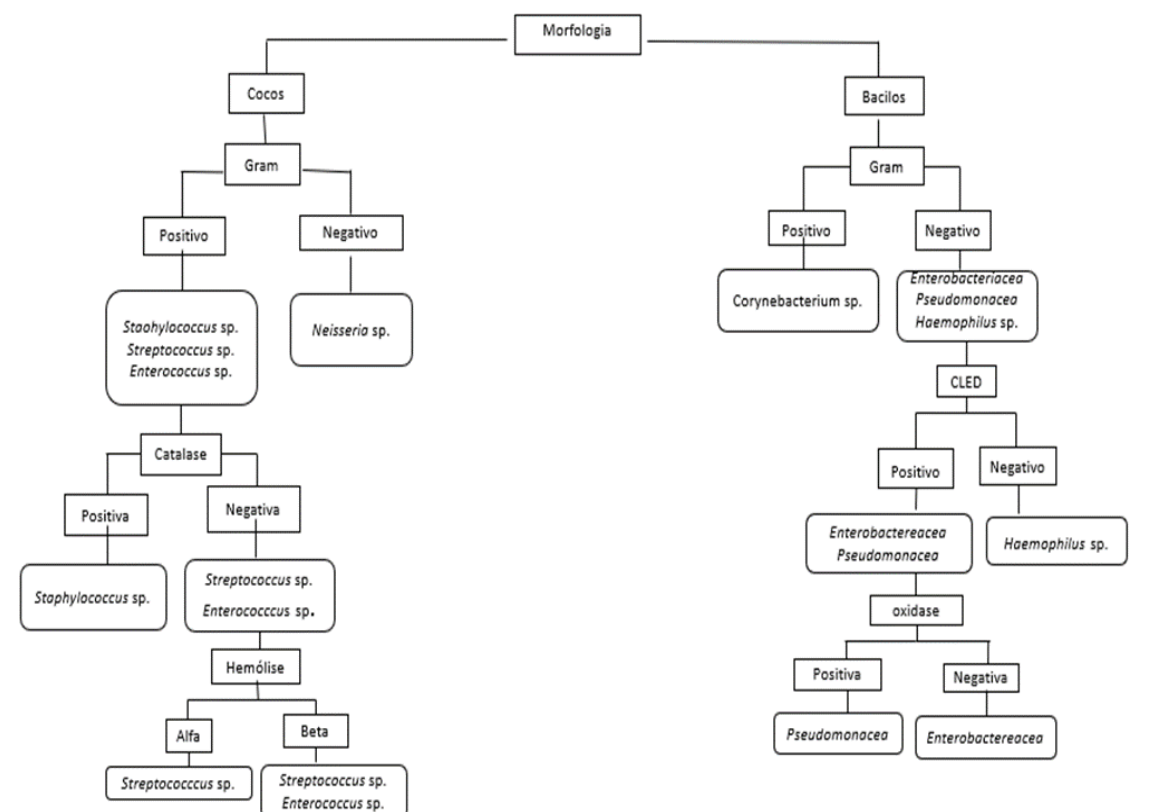


Figura 7: Esquema utilizado no setor como guia para a identificação de bactérias. Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

3.2.1) Identificação preliminar presuntiva pelas características das colónias e por provas bioquímicas

a) Identificação preliminar pelas características das colónias

A observação das colónias que se desenvolveram nos meios utilizados no processamento de determinada amostra pode dar informações preliminares sobre o grupo de microrganismos a que corresponde. Como tal, é importante ter em conta as seguintes características: a morfologia; a cor; o tamanho; a consistência; o tipo de hemólise (nos meios adequados e quando presente); se fermentam ou não os açúcares existentes no meio; e até mesmo o cheiro. (Fonseca *et al.*, 2004)

Relativamente à hemólise existem três tipos: a α -hemólise, em que a hemólise é parcial e as colónias apresentam um halo esverdeado em seu redor; a β -hemólise, em que há hemólise total e as colónias apresentam um halo incolor em seu redor; e a γ -hemólise, em que não se observa hemólise. A hemólise é observada em geloses com sangue adicionado, como a gelose COS. (Fonseca *et al.*, 2004)

c) Identificação através de provas bioquímicas

➤ Teste da catalase

Este teste deteta a presença da enzima catalase e permite a diferenciação entre *Staphylococcus* sp. (catalase positiva) e *Streptococcus* sp. (catalase negativa). Esta enzima degrada o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. A formação de bolhas indica que a prova é positiva. Quando as colónias são retiradas de gelose que contém sangue é necessário ter cuidado na interpretação do resultado, uma vez que os eritrócitos possuem catalase e podem originar falsos positivos. (Fonseca *et al.*, 2004)

➤ Teste da coagulase

Permite detetar a enzima coagulase produzida principalmente pelas estirpes de *Staphylococcus aureus*. A coagulase atua no fibrinogénio convertendo-o em fibrina insolúvel. A formação de um coágulo após incubação indica a positividade do teste. (Fonseca *et al.*, 2004)

➤ Teste da Urease

Permite detetar a presença da enzima urease, uma enzima que hidrolisa a ureia em CO₂ e amónia. Na presença da enzima, o meio sofre uma alcalinização devido á libertação de amónia e adquire uma cor rosa forte. Permite distinguir Enterobactérias urease positiva (ex.: *Proteus* sp.) de urease negativa (Ex.: *Escherichia coli*). (Brink, 2010)

➤ **Teste da oxidase**

Este teste permite detetar a presença da enzima citocromo oxidase e é útil para distinguir Enterobactérias (oxidase negativa) de *Pseudomonas* (oxidase positiva). A presença de citocromo oxidase produz cor roxa na tira de papel de filtro utilizada neste teste. (Fonseca *et al.*, 2004)

➤ **Teste da Optoquina**

A optoquina é um antibiótico que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* com um halo de inibição ≥14mm.

Para a realização deste teste é necessária a preparação de uma suspensão 0,5 McFarland a partir do microrganismo que se pretende identificar. Esta suspensão é inoculada numa gelose MHF (Muller Hinton Fastidious) pela técnica de Kirby-Bauer e depois, com a ajuda de uma pinça esterilizada, coloca-se um disco de optoquina. A placa incuba a 37°C durante 18-24h, em atmosfera de CO₂. (Fonseca *et al.*, 2004)

➤ **Teste de suscetibilidade ao Metronidazol**

Este teste é utilizado para diferenciar bactérias anaeróbias (sensíveis) de bactérias aeróbias (resistentes). A técnica para a realização deste teste é semelhante à descrita anteriormente, com a diferença de que a sementeira incuba em condições de anaerobiose. A presença de um halo de inibição ao redor do disco de antibiótico indica que o microrganismo é anaeróbio. (Gaetti-Jardim Jr. *et al.*, 2007)

➤ **Sistemas de identificação baseados em substratos fluorogénicos e cromogénicos modificados**

Por vezes no setor de Microbiologia utiliza-se o Sistema de identificação de microrganismos ID BD BBL Crystal, nomeadamente quando é necessário identificar bactérias que não constam nas cartas de identificação do Sistema Vitek® 2. Trata-se de um sistema de identificação que contém 29 substratos bioquímicos e enzimáticos. Os substratos são rehidratados pela adição de uma suspensão bacteriana 0,5 McFarland e após 18-24h de incubação a 37 ° C a alteração da cor é interpretada. É feita uma leitura colorimétrica e fluorométrica, bem como uma interpretação dos resultados num bionúmero que se converte numa identificação com probabilidade determinada.

3.2.2) Teste de Identificação e Teste de sensibilidade aos antibióticos pelo sistema Vitek® 2

As cartas para a identificação automática têm especificidade para um dado grupo de microrganismos, pelo que a escolha da carta a utilizar é baseada nas características anteriormente descritas. Depois de escolher a carta procede-se à elaboração de uma suspensão, obtida com o auxílio de uma zaragatoa com a qual se retira uma quantidade das colónias do microrganismo a identificar. A suspensão tem como base 3 mL de solução salina, na qual é descarregada a zaragatoa. A densidade da suspensão é determinada com um densitómetro e depende da carta a utilizar.

A partir desta suspensão faz-se sempre um controlo ID, que consiste na inoculação de uma gota desta suspensão numa gelose igual à gelose de onde se retiraram as colónias do microrganismo que se pretende identificar. Esta placa de controlo ID tem como objetivo preservar o microrganismo e garantir que a identificação e o teste de suscetibilidade aos antibióticos foram realizados a partir de culturas puras.

Na tabela 8 estão descritos os tipos de cartas de ID utilizadas, o grupo de microrganismos para o qual estão adequadas e a respetiva densidade a respeitar. As densidades estabelecidas respeitam a escala de McFarland, que associa o grau de turvação de uma solução à concentração bacteriana presente na mesma.

Tabela 8: Tipos de cartas utilizadas pelo sistema Vitek® 2, grupos de microrganismos que permitem identificar e respetiva densidade associada

Tipo de carta de ID	Microrganismos	Densidade de McFarland
GN	Gram negativo	0,6-0,63
GP	Gram positivo	0,6-0,63
YST	Leveduras	1,8-2,20
ANC	Anaeróbios e <i>Corynebacterium</i> spp	2,70-3,30
NH	<i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. e outros microrganismos fastidiosos	2,70-3,30

Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

A suspensão para a realização do TSA é obtida a partir da suspensão para ID, da qual é transferido um valor estabelecido em função da carta de TSA a utilizar. Para os grupos inseridos nas cartas ANC e NH não existem TSA automatizados.

Na tabela 9 estão descritos os tipos de cartas de TSA utilizadas, o grupo de microrganismos que identificam e o respetivo volume necessário.

Tabela 9: Tipo de cartas de TSA utilizadas pelo sistema Vitek® 2, grupo de microrganismos a que se destinam e respetivo volume a pipetar.

Tipo de carta de TSA	Grupo de microrganismos a que se destinam	Volume a pipetar para TSA
355	GN (<i>Enterobacteriaceae</i>)	145 µl
373	GN (<i>Pseudomonaceae</i>)	145 µl
586	GP (<i>Streptococcus</i> sp. (hemólise não α) <i>Enterococcus</i> sp.)	280 µl
648	GP (<i>Staphylococcus</i> sp.)	280 µl
ST-03	GP (<i>Streptococcus</i> sp. α-hemolíticos)	280 µl
YS08	Leveduras	280 µl

Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

3.2.3) Testes manuais de suscetibilidade aos antibióticos

a) Método de difusão em disco (Kirby-Bauer)

De acordo com o descrito nas normas EUCAST, utiliza-se uma suspensão bacteriana 0,5 McFarland das colónias em que se pretende testar a suscetibilidade. A suspensão é inoculada numa gelose Mueller-Hinton (MH) ou MHF, dependendo da estirpe em causa, pela técnica da sementeira em toalha. Os discos de papel de filtro impregnados com o respetivo antibiótico são colocados dispersamente pela gelose (máximo de 5 discos). Após 16-20h de incubação a 37°C as placas são observadas e medem-se os halos de inibição em redor dos discos de modo a classificar o microrganismo como resistente (R), sensível (S) ou intermédio (I) de acordo com as regras de EUCAST. (EUCAST, 2020)

b) E-test

A preparação do E-test é semelhante à do método de difusão em disco, no entanto os discos de papel de filtro são substituídos por tiras de reagente que têm um gradiente contínuo de determinado antibiótico. As tiras estão marcadas com uma escala de gradiente de antibiótico. A gelose incuba 16-20h a 37°C e após terminar a incubação observa-se a zona de inibição elíptica e lê-se o valor da MIC (Concentração Mínima Inibitória). (Fonseca *et al.*, 2004)(Sader e Pignatari, 1994)

3.3) Deteção de mecanismos de resistência aos antibióticos

Os mecanismos de resistência aos antibióticos adquiridos pelos microrganismos são um problema de Saúde Pública a nível mundial. Existem vários mecanismos de resistência, sendo que os 4 principais são: modificação ou destruição enzimática do antibiótico (por exemplo a destruição dos β -lactâmicos pelas enzimas β -lactamases); redução da permeabilidade celular ao antibiótico ou existência de bombas de efluxo dos antibióticos das células bacterianas; alterações das moléculas alvo dos antibióticos; produção de moléculas alvo que não são inibidas pelo antibiótico. (Loureiro *et al.*, 2016)

No Setor de Microbiologia faz-se pesquisa de β -lactamases de espectro alargado (BLSE) e de carbapenemases (CAT). As β -lactamases hidrolisam o anel β -lactâmico de antibióticos como as penicilinas e as cefalosporinas, tornando-os inativos. Devido a novas mutações surgiram β -

lactamases com capacidade para hidrolisar o anel β -lactâmico de cefalosporinas de terceira geração e dos monobactâmicos, as denominadas BLSE. As carbapenemases são um grupo específico de β -lactamases capazes de hidrolisar carbapenemos. (Abrantes e Nogueira, 2017) (Paterson e Bonomo, 2005)

As **BLSE** pesquisam-se, de acordo com as normas EUCAST, quando no sistema Vitek[®] 2 as cefalosporinas de terceira geração (Cefotaxima e Ceftazidima) apresentam MIC >1 mg/mL. Para tal procede-se à elaboração de uma suspensão bacteriana 0,5 McFarland que é inoculada em gelose Mueller-Hinton pela técnica da sementeira em toalha. São colocados dois ou três discos de antibiótico específicos consoante o microrganismo tenha AmpC indutíveis ou não, conforme esquematizado na figura 8. As AmpC são β -lactamases capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas da 1^a à 3^a geração, cefamicinas e inibidores de beta-lactamases.

Quando se verifica um aumento do diâmetro do halo ao redor do disco de Amoxicilina + Ácido Clavulânico (sinergismo), indica presença de BLSE, ou seja, a pesquisa de BLSE é positiva. A espécie *Escherichia-coli* e o género *Klebsiella* spp. são apontados como principais produtores de β -lactamases de espectro alargado. (Lago, Fuentefria e Fuentefria, 2010)

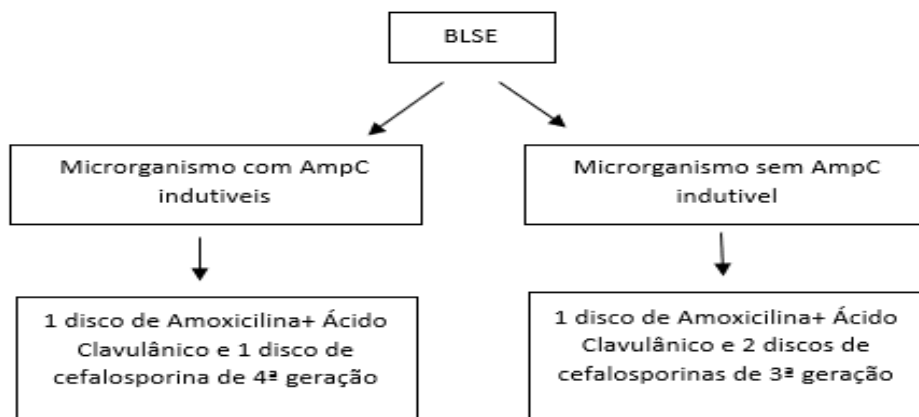


Figura 8: Esquema utilizado no Setor como guia para o procedimento de pesquisa de BLSE. Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

A pesquisa de **CAT** faz-se quando a MIC do Ertapenemo é ≥ 0.12 . O procedimento é em tudo igual ao da pesquisa de BLSE com a diferença de que o disco utilizado é um disco de Faropenemo. Se não houver halo de inibição ou se houver crescimento de colónias dentro do halo de inibição indica que o microrganismo é resistente ao antibiótico e, portanto, é um

provável produtor de carbapenemases. No Setor de Microbiologia existe um Kit comercial que permite identificar 3 tipos de carbapenemases por técnica imunocromatográfica: Oxa-48, KPC e NDM.

As enterobactérias são as que mais frequentemente produzem carbapenemases, nomeadamente géneros como: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella*. (Seibert et al., 2014)

Na figura 9 está representada uma placa de gelose Mueller-Hinton com pesquisa de BLSE negativa (A) e outra com BLSE positiva (B). A pesquisa de CAT é negativa em ambas.

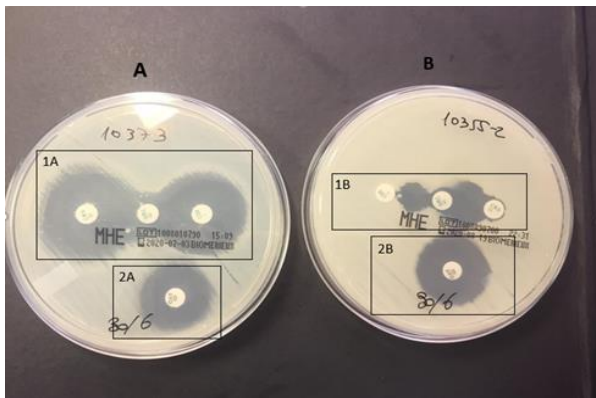


Figura 9: A) placa de gelose MH evidenciando pesquisa de BLSE negativa (1A) e pesquisa de CAT negativa (2A); B) placa de gelose MH evidenciando pesquisa de BLSE positiva (1B) e pesquisa de CAT negativa (2B). Fonte: Setor de Microbiologia do IPO de Coimbra.

3.4) Análise Molecular

A Análise Molecular é uma das vertentes mais importantes nos dias de hoje em termos de pesquisa na área médica, pois fornece um diagnóstico rápido, preciso e sensível. (Siqueira e Almeida, 2018)

No serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra, os testes de Análise Molecular realizam-se no equipamento GeneXpert®, que fornece resultados através de ensaios de PCR em tempo real (RT-PCR). No Setor de Microbiologia recorre-se a este sistema para pesquisa de:

- **Carbapenemases**, nomeadamente OXA-48, VIM, KPC, NDM e IMP-1;
- ***Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)**: a resistência à meticilina advém da aquisição do gene *mecA*, por parte do microrganismo, que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP) que não tem afinidade para os antibióticos β -lactâmicos, impedindo assim a sua ação. (Gelatti et al., 2009)

- ***Mycobacterium tuberculosis* e mutações do gene *rpoB***: mutações neste gene conferem resistência à rifampicina, um dos antibióticos mais utilizados para tratamento da tuberculose. O gene *rpoB* codifica a cadeia β da RNA polimerase, local de ação da rifampicina. (Carvalho *et al.*, 2007)

3.5) Caso Clínico

Paciente do sexo feminino, 27 anos, apresenta-se na Consulta Externa de Cirurgia Maxilo-Facial com o lábio edemaciado e com sinais de abscesso (figura 10). Foi pedido ao laboratório, nomeadamente ao Setor de Microbiologia, que fosse apoiar uma colheita em condições de anaerobiose.

Foi efetuada drenagem cirúrgica do abscesso e colocada a amostra em frasco PORTAGERM[®] para viabilizar anaeróbios e em contentor estéril e enviada ao laboratório para identificação bacteriológica.

A amostra foi semeada em meio COS, BHI e KCS e em meio SCS reduzido a partir da amostra transportada em condições de anaerobiose. Os meios incubaram 24h a 37°C, com exceção do SCS que incubou 5 dias em atmosfera desprovida de oxigénio. Após terminar o tempo de incubação, verificou-se desenvolvimento de colónias apenas nos meios incubados para anaerobiose (figura 11). Efetuou-se repicagem das colónias desenvolvidas para COS e para SCS e coloração de Gram, bem como testes com discos de metronidazol e tobramicina. Os microrganismos anaeróbios são sensíveis ao metronidazol e resistentes à tobramicina.

Confirmou-se que o microrganismo presente se tratava de um anaeróbio e na observação microscópica observaram-se bacilos Gram negativo. Seguidamente foi feita identificação com carta ANC no sistema Vitek[®]2 e o resultado obtido foi *Prevotella intermedia*.



Figura 10: Lábio edemaciado e com sinais de abscesso. Fonte: Consulta Externa de Cirurgia Maxilo-Facial do IPO de Coimbra

A espécie *Prevotella intermedia* pertence à ordem Bacteroidales e, tal como referido acima, trata-se de um bacilo Gram negativo anaeróbio. Geralmente coloniza o ser humano (nomeadamente as mucosas) e não provoca infeções, no entanto se o sistema imunológico estiver debilitado podem surgir infeções oportunistas,

nomeadamente gengivite e periodontite.

Este microrganismo tem a capacidade de

reduzir a resposta imune do hospedeiro, por exemplo por indução da disfunção em neutrófilos e apresentam fatores de virulência como produção de enzimas hidrolíticas, produção de proteases e β -lactamases, presença de adesinas e estimulação de fatores de crescimento no hospedeiro. (Larsen, 2015)

A paciente iniciou antibioterapia com clindamicina e ficou bem. A clindamicina é um antibiótico indicado para bacilos anaeróbios produtores de β -lactamases. (Alfenas *et al.*, 2014)

4. Setor de Bioquímica

A grande maioria das amostras que chega ao setor de bioquímica são amostras de sangue total em tubos que contém esferas de sílica ativadoras da coagulação (tubos de soro). No entanto, este setor também recebe amostras como: urina, sangue total com EDTA (para teste de hemoglobina glicada), sangue total em seringa para cálcio ionizado e sangue arterial em seringa para gasometria.

Tal como nos outros setores, quando as amostras chegam são registadas. Seguidamente, os tubos de soro são colocados a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos para obter a total separação entre soro e os restantes componentes sanguíneos. Após a centrifugação é importante verificar se as amostras apresentam interferentes como hemólise ou fibrina, por exemplo.

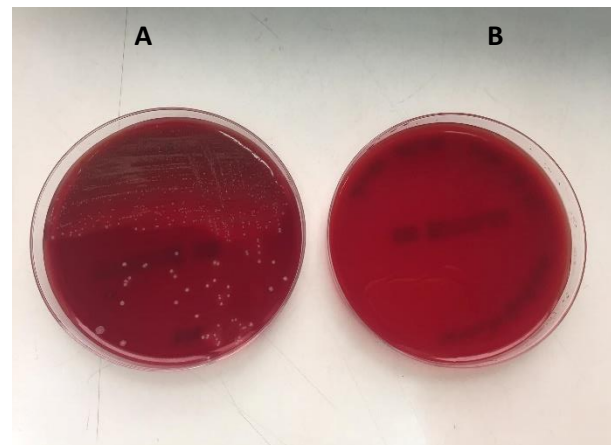


Figura 11: **A)** Meio SCS reduzido com crescimento de colónias. **B)** Meio COS sem crescimento de colónias.
Fonte: Setor microbiologia do IPO de Coimbra.

Com exceção das gasometrias, do cálcio ionizado e da hemoglobina glicada, todos os restantes testes bioquímicos são realizados em amostras de soro.

Na tabela 10 estão representados os principais equipamentos do setor, bem como os respetivos métodos de análise e os parâmetros que avaliam.

Tabela 10: Principais equipamentos do Setor de Bioquímica, parâmetros determinados e respetivos métodos de determinação.

Nome do equipamento	Parâmetros determinados	Método
Atellica CH Analyser	Ferro, fosfatase alcalina, Gama-GT, glucose, ureia, colesterol, LDL, etc.	Espetrofotometria e Potenciometria indireta
ABL® 800 Flex	Gasometria, eletrólitos (Cl ⁻ , Na ⁺ , K ⁺), cálcio ionizado, glucose, lactato.	Potenciometria e Amperometria
RapidChem® 744	K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻	Potenciometria direta
RapidLab® 1265	Gasometria, eletrólitos (Cl ⁻ , Na ⁺ , K ⁺), cálcio ionizado, glucose, lactato.	Potenciometria e Amperometria

Fonte: Setor de Bioquímica do IPO de Coimbra.

5. Setor Imunologia

No setor de Imunologia a grande maioria dos testes realizam-se por ensaios imunoenzimáticos automatizados que têm por base a formação de complexo antígeno- anticorpo. Estes ensaios podem ser de dois tipos: técnica de imunoensaio competitiva e técnica de imunoensaio por método de “sandwich”.

Os testes são maioritariamente realizados em soro obtido através de centrifugação a 3000 r.p.m durante 10 minutos. Os tubos utilizados para recolher amostras para realização dos testes neste setor são tubos que contêm esferas ativadoras de coagulação e um gel, que serve para separar os constituintes do sangue após a centrifugação. As amostras para doseamento de hormona paratiroideia (PTH), – hormona adrenocorticotrófica (ACTH), Metanefrinas e marcadores cardíacos são colhidas em tubos de EDTA que são posteriormente centrifugados nas mesmas

condições dos restantes, com exceção da ACTH e das Metanefrinas que são centrifugadas a 4°C. No setor também se realizam análises em urina como é o caso da proteinúria de Bence-Jones, iodo urinário, cortisol urinário.

Para além dos ensaios imunoenzimáticos realizam-se radioimunoensaios (RIA), nos quais se usa um antigénio marcado com iodo radioativo. Estes ensaios são realizados por técnicas manuais e as leituras são feitas num contador γ .

São muitos os parâmetros analisados no setor de Imunologia, tais como: hormonas, marcadores tumorais, proteínas, imunoglobulinas, metabolitos, entre outros.

Na tabela II estão apresentados os principais equipamentos utilizados e o método que utilizam para a análise dos parâmetros.

Tabela II: Principais equipamentos utilizados diariamente no setor de Imunologia e respetivo método de análise que utilizam.

Equipamento	Método de análise
Immolute® 2000 XPI (Siemens)	Imunoensaios com deteção por quimioluminescência
ADVIA Centaur® XP (Siemens)	
Kryptor® Compact Plus (Brahms instruments)	Imunoensaios com deteção por fluorescência
Cobas® 6000 e601 (Roche Diagnostics)	Imunoensaios com deteção por eletroquimioluminescência
BN ProSpec® (Siemens)	Imunoensaios com deteção por nefelometria
Optilite® (Binding site)	Imunoensaios com deteção por turbidimetria
Hydrasis® (Sebia)	Eletroforese de proteínas

Fonte: Setor de Bioquímica do IPO de Coimbra.

Relativamente às técnicas manuais, realizam-se para: Metanefrina e Normetanefrina (metabolitos das catecolaminas Epinefrina e Norepinefrina, respetivamente), Testosterona livre, ácido 5-hidroxi-3-indol acético (5-HIAA), Ácido Vanilmandélico, entre outros. Estas técnicas manuais utilizam ensaios competitivos.

Conclusão

O estágio no qual incide o presente relatório permitiu-me contactar com várias amostras e metodologias que fazem parte da rotina de um laboratório clínico. Sem dúvida que consolidei muito dos conhecimentos teóricos que adquiri no Mestrado, embora alguns não tanto quanto gostaria por não ter surgido oportunidade.

O laboratório do Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra representa a realidade da grande maioria dos laboratórios da atualidade no sentido em que praticamente todos os testes são realizados em autoanalisadores, o que em termos de resultados rápidos e diminuição dos erros humanos é uma grande mais valia.

Relativamente à minha passagem pelos quatro setores do serviço concluo que: o Setor de Bioquímica é o mais mecanizado e foi onde sinto que desenvolvi e consolidei menos competências; o Setor de Imunologia fez-me perceber que a unidade curricular de Endocrinologia era importante no plano de estudos do Mestrado; o Setor de Hematologia permitiu-me observar ao microscópio várias células quer normais quer com alterações, identificá-las e associá-las a patologias; e por último o Setor de Microbiologia permitiu-me praticar grande maioria dos procedimentos utilizados naquele laboratório e foi o Setor que mais me cativou por ser o menos automatizado.

Referências

- ABRANTES, Jaime Antonio; NOGUEIRA, Joseli Maria Da Rocha - Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 49:3 (2017). ISSN 2448-3877.
- ALFENAS, Cristiane Ferreira *et al.* - Antibióticos no tratamento de abscessos perirradiculares agudos. **Revista Brasileira de Odontologia**. 71:2 (2014) 120–123. doi: lil-766096.
- ANVISA - Microbiologia Clínica Para O Controle De Infecção Relacionada À Assistência À Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. (2010).
- BAIN, Barbara J. *et al.* - **Dacie And Lewis Practical Haematology**. 11. ed. [S.l.] : Churchill Livingstone, 2011. ISBN 9780702034084.
- BALAGUÉ, Olga; COLOMO, Lluís; CAMPO, Elías - Linfoma de células do manto. **Revista espanhola de Patologia**. . ISSN 19890389. 37:2 (2004) 159–172. doi: 10.1016/j.labcli.2015.08.002.
- BARCIA, Juan José - The giemsa stain: Its history and applications. **International Journal of Surgical Pathology**. . ISSN 10668969. 15:3 (2007) 292–296. doi: 10.1177/1066896907302239.
- BOCHEN, Krzysztof *et al.* - Erythrocyte sedimentation rate – an old marker with new applications. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**. 5:2 (2011) 50–55.
- BOTTINI, Paula Virginia - Testes laboratoriais para avaliação do componente monoclonal. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. . ISSN 15168484. 29:1 (2007) 23–26. doi: 10.1590/S1516-84842007000100006.
- BRINK, Benita - **Urease Test Protocol** (2010). Disponível <https://asm.org/getattachment/ac4fe214-106d-407c-b6c6-e3bb49ac6ffb/urease-test-protocol-3223.pdf>.
- CANÇADO, Rodolfo D.; CHIATTONE, Carlos S. - Anemia de Doença Crônica. **Rev.bras.hematol.hemoter**. 24:2 (2002) 127–136.
- CARVALHO, Wânia Da Silva *et al.* - Diagnóstico de resistência do Mycobacterium tuberculosis à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**. 43:1 (2007) 31–38. . ISSN 15169332.
- CHA, Choong-Hwan *et al.* - Erythrocyte Sedimentation Rate Measurements by TEST 1 Better Reflect Inflammation Than Do Those by the Westergren Method in Patients With Malignancy, Autoimmune Disease, or Infection. **American Journal of Clinical Pathology**. 131:2009) 189–194. doi: 10.1309/AJCP0UIASTLRANIJ.
- COSTA, André Nathan *et al.* - Microbioma pulmonar: desafios de um novo paradigma. **Jornal Brasileiro Pneumologia**. 44:5 (2018) 1–9.
- DIAS, Fernando De Almeida; MARTINS, Kassya Lopes Epaminondas; COSTA, Sérgio Henrique

Nascente - Alternative method evaluation of internal quality control in the Clinical Laboratory of Pontifical Catholic University of Goiás. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 50:1 (2018). ISSN 2448-3877.

ELMOR DE ARAUJO, Maria Rita - Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **Journal of Infection Control**. . ISSN 2316-5324. 1:1 (2012) 8–19.

EUCAST - **Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing** (2020). Disponível em www.eucast.org.

F. ABREU, Jessica S. *et al.* - Models for releasing the lupus anticoagulant test. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 54:3 (2018) 153–157. doi: 10.5935/1676-2444.20180024.

FERREIRA, Cláudia Natália *et al.* - O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. . ISSN 15168484. 32:5 (2010) 416–421. doi: 10.1590/S1516-84842010000500016.

FONSECA, Ana *et al.* - Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. **Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge**. 2004) 1–193.

GAETTI-JARDIM JR., Elerson *et al.* - Susceptibilidade de bactérias anaeróbias isoladas de infecções periimplantares e periodontais ao Metronidazol, Lincosaminas, Macrolídeos e Tetraciclina. **Revista Odonto Ciência-Fac. Odonto/PUCRS**. (2007). Disponível em <https://core.ac.uk/download/pdf/25531437.pdf>.

GELATTI, Luciane Cristina *et al.* - Staphylococcus aureus resistentes à metilina: Disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 84:5 (2009) 501–506. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-05962009000500009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. ISSN 1806-4841.

GUAREZE, Gabriela Massarotto; BORDIGNON, Jardel Cristiano - Estudo comparativo entre hemocultura automatizada e manual em um laboratório do sudoeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. (2016). Disponível em <http://www.rbac.org.br/artigos/estudo-comparativo-entre-hemocultura-automatizada-e-manual-em-um-laboratorio-do-sudoeste-do-parana-brasil-48n-3/>>.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano Da Silva; PUPO, Mônica Tallarico - Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. . ISSN 16787064. 33:3 (2010) 667–679. doi: 10.1590/S0100-40422010000300035.

HOFFBRAND, A. Victo.; MOSS, Paul A. - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7ª ed. Porto Alegre : [s.n.]. ISBN 9788582714515.

JÚNIOR, Diniz Pereira Leite *et al.* - Species of Candida isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 86:4 (2011) 675–80. . Disponível <https://www.scielo.br/pdf/abd/v86n4/v86n4a08.pdf>.

- LAGO, Aldalise; FUENTEFRIA, Sergio Roberto; FUENTEFRIA, Daiane Bopp - ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 43:4 (2010) 430–434. . Disponível em :http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822010000400019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. ISSN 00378682.
- LARSEN, Jeppe Madura - Prevotella intermedia: A brief review. **Periodontia**. 151:4 (2015) 363–374. Disponível em :<http://pmc/articles/PMC5506432/?report=abstract>>. ISSN 13652567.
- LOPES, Hélio Vasconcellos; TAVARES, Walter - Diagnóstico das infecções do trato urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 51:6 (2005). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302005000600008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. ISSN 1806-9282.
- LOUREIRO, Rui João *et al.* - Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saude Publica**. 34:1 (2016) 77–84.. Disponível em :<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>>. ISSN 08709025.
- MAKI, Dennis G.; WEISE, Carol E.; SERAFIN, Harold W. - A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **The New England Journal of Medicine**. . ISSN 0028-4793. 296:23 (1977) 230–234. doi: 10.1056/NEJM198603273141302.
- MARQUES, Patrícia Bentes; CARNEIRO, Flavia Matilla Colares; FERREIRA, Alcione Pena - Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. . ISSN 2176-6223. 2:1 (2011) 53–58. doi: 10.5123/s2176-62232011000100006.
- MARTINS, Daniele Minguini; GAGLIANI, Luiz Henrique - Importância da Citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das Leucemias. **Revista UNILUS - Ensino e Pesquisa**. (2009). 5:8 5–12. Disponível em :<http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/view/39>>.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Microbiologia Médica**. 6^a ed. Rio de Janeiro : [s.n.]. ISBN 978-85-352-3446-6.
- OLIVEIRA, Cristiane F.; FERNANDES, Talma Reis Leal - Analysis of the pre-analytical phase in a private pathology laboratory of Maringá city-PR, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. . ISSN 16784774. 52:2 (2016) 78–83. doi: 10.5935/1676-2444.20160016.
- PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. - Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**. . ISSN 08938512. 18:4 (2005) 657–686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
- REZENDE, Suely Meireles - Distúrbios da Hemostasia: doenças hemorrágicas. **Rev Med Minas Gerais**. 20:4 (2010) 534–553.
- RIVAROLA CM *et al.* - Trombocitosis en Pediatría: posibles causas en una población internada. **Pediatría (Asunción)**. . ISSN 1683-9803. 36:1 (2009) 16–20.
- SADER, Hélio S. *et al.* - Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade: resultados brasileiros do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos dos anos de

1997 e 1998. **Jornal de Pneumologia**. . ISSN 0102-3586. 27:1 (2001) 25–34. doi: 10.1590/s0102-35862001000100006.

SADER, Helio Silva; PIGNATARI, Antonio Carlos - E test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing. **São Paulo medical journal**. . ISSN 15163180. 112:4 (1994) 635–638. doi: 10.1590/s1516-31801994000400003.

SANTOS, V. M.; CUNHA, S. F.; CUNHA, D. F. - Erythrocyte sedimentation velocity: current use and limitations. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**. . ISSN 01044230. 46:3 (2000) 232–236. doi: 10.1590/s0104-42302000000300008.

SEIBERT, Gabriela *et al.* - Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**. 12:3 (2014) 282–288. doi: 10.1590/S1679-45082014AO3131.

SILVA, Paula - Conhecer a doença: os doentes em primeiro lugar. **Revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto**. 36:2018) 119–144. Disponível em :http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-34192018000300007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. ISSN 08723419.

SIQUEIRA, João Paulo Zen; ALMEIDA, Margarete T. G. - Biologia Molecular como ferramenta de detecção fúngica no sangue: auxílio diagnóstico e redução de gastos. **Arquivos de Ciências da Saúde**. 25:3 (2018). Disponível em :<http://www.cienciasdasaude.famerp.br/index.php/racs/article/view/1127/771>>.

TOMAZ, Ana Paula O. *et al.* - The detection of Bence Jones protein in urine by the heat test helps in diagnosis of multiple myeloma? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. . ISSN 16784774. 53:1 (2017) 20–23. doi: 10.5935/1676-2444.20170006.

TRIPODI, Armando - D-Dimer Testing in Laboratory Practice. Em **Clinical Chemistry** [Disponível em :<https://academic.oup.com/clinchem/article/57/9/1256/5620938>>. ISBN 00099147. 57:9 (2011) 1256-1262. p. 1256–1262.

TURGEON, Mary L. - **Clinical Hematology: Theory and Procedures**. 5^a ed. Baltimore : [s.n.]. ISBN 978-1-60831-076-0.

VASSALLO, José; MAGALHÃES, Silvia M. M. - Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. . ISSN 15168484. 31:4 (2009) 267–272. doi: 10.1590/s1516-84842009005000062.

VIEIRA, Ana Júlia Hoffmann; SANTOS, Jairo Ivo Dos - Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 49:3 (2017). ISSN 2448-3877.

WILDNER, Leticia Muraro *et al.* - MICOBACTÉRIAS : EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO. **Revista de Patologia Tropical**. 40:3 (2011) 207–229. Disponível em :<https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/15972/9822>>.

Anexos

- **Técnica da coloração de Gram:**

1º) Aplicar, depois do processo de fixação das células às lamínas, o primeiro corante, violeta de genciana, durante 1 minuto;

2º) Desprezar o corante em excesso e aplicar soluto de lugol durante 30 segundos;

3º) Aplicar álcool-acetona (diferenciador) gota a gota até descorar;

4º) Lavar em água corrente;

5º) Aplicar o segundo corante-fucsina diluída- durante 30 segundos;

6º) Lavar em água corrente e secar.

- **Meios de cultura:**

Os meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia: a tabela 12 apresenta os meios de cultura mais utilizados durante o meu período de estágio, a respetiva classificação e composição.

Tabela 12: Meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia.

Meio de cultura	Classificação/ Composição
BHI (Brain Heart Infusion)	Meio líquido enriquecido com cérebro e coração de vitela; utilizado para bactérias aeróbias exigentes.
CLED (Cistina- Lactose- Deficiente de electrólitos)	Meio sólido não seletivo, diferencial; a lactose permite diferenciar os fermentadores e a deficiência de electrólitos inibe o “swarming” de <i>Proteus spp.</i> Muito utilizado para a amostras de urina pois permite o crescimento dos microrganismos mais comuns nas infeções urinárias e a contagem de colónias.
CNA (Gelose Columbia com 5% de sangue, colistina e ácido nalidíxico)	Meio sólido seletivo para bactérias Gram positivo; a colistina e o ácido nalidíxico inibem o crescimento de Enterobactérias e <i>Pseudomonas</i> .
COS (Gelose Columbia)	Meio sólido não seletivo com adição de sangue, o que o torna nutritivo permitindo o crescimento da maioria dos microrganismos. O sangue adicionado permite ver a hemólise.

LJ (Löwenstein-Jensen)	Meio sólido para micobactérias enriquecido e seletivo.
KCS (Schaedler + Vitamina K3)	Meio líquido adequado ao crescimento de bactérias anaeróbias, presença de fatores de crescimento como hemina, extrato de levedura e vitamina K.
MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube)	Meio líquido para crescimento de micobactérias; contém antibiótico. A leitura do crescimento neste meio é feita por fluorescência.
MH (Muller – Hinton)	Meio sólido não seletivo utilizado principalmente para os testes de sensibilidade aos antibióticos.
PVX (Gelose Polyvitex)	Meio sólido composto por sangue cozido- para haver liberação de fatores hemina (fator X) e NAD (fator V); muito utilizado para crescimento de Haemophilus spp.
SCG (Gelose Sabouroud Gentamicina e Cloranfenicol)	Meio sólido seletivo para isolamento de fungos e leveduras; Gentamicina inibe a maioria das bactérias e o pH ácido favorece o crescimento de fungos
SCS (Gelose Schaedler +5% sangue)	Meio sólido indicado para o desenvolvimento de bactérias anaeróbias estritas por ser bastante nutritivo e não seletivo.

- **Técnica de Kinyoun:**

- 1º) Aplicar o corante carbolfucsina à amostra em lâmina, durante 4 minutos;
- 2º) Lavar em água corrente;
- 3º) Aplicar o diferenciador (etanol e HCL) por 5 segundos;
- 4º) Lavar em água corrente;
- 5º) Aplicar o corante verde- brilhante e deixar atuar 30 segundos;
- 6º) Lavar em água corrente e secar.

- **Técnica da homogeneização:**

Inclui a descontaminação, fluidificação e concentração da amostra.

É aplicada em amostras não estéreis onde se pretende pesquisar micobactérias pois estas bactérias, quando presentes, estão em pequena quantidade pelo que é necessário concentrá-las e eliminar a restante microbiota associada à amostra.

A técnica consiste em:

- 1) Colocar 10 mL de amostra e a mesma quantidade de NaOH/NaCl num tubo de centrífuga e agitar no vortex até a amostra estar liquefeita;
- 2) Manter em repouso 15 minutos à temperatura ambiente;
- 3) Adicionar tampão fosfato (pH=6,8) até perfazer 50mL;
- 4) Centrifugar 15-20 minutos a 3000g;
- 5) Descartar o sobrenadante e preparar 2 lâminas de esfregaço para coloração Kinyoun;
- 6) Adicionar cerca de 10mL de tampão fosfato e ressuspender o sedimento;
- 7) Verificar o pH e se necessário ajustá-lo;
- 8) Proceder à inoculação dos meios.